

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Cambios metabólicos y pérdida de peso durante el ayuno

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Carmen Agrasal y Aragón

DIRECTOR:

Jorge Tamarit Torres

Madrid, 2015

María del Carmen Agrasal y Aragón

TP
1981
020



* 5 3 0 9 8 5 4 5 8 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-005670-6

CAMBIO METABOLICOS Y PERDIDA DE PESO DURANTE EL AYUNO.

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© María del Carmen Agrasal y Aragón
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-22-1981

CAMBIOS METABOLICOS Y PERDIDA DE PESO DURANTE
EL AYUNO.-

M^a del Carmen AGRASAL Y ARAGON

Tesis Doctoral

Prof. Dr. D. J. TAMARIT TORRES

Cátedra de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid, 1979

A mi madre

AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Fisiología General y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Representa una gran satisfacción personal completar una labor que en sus comienzos presentó los inconvenientes de todo trabajo experimental, pero que a lo largo de su realización se han ido resolviendo felizmente con los conocimientos y experiencia que ello proporciona.

A esto ha contribuido en gran manera, la labor de dirección del Prof. Dr. J. Tamarit, quien con su paciencia y comprensión ha sabido encauzar las ideas que surgían a lo largo de su desarrollo; así como su profundo conocimiento del tema le ha permitido resolver cuantos problemas se iban planteando de forma progresiva; aunque sabemos que ello ha sido gracias a utilizar un tiempo para él muy necesario.

Al Prof. Dr. G. Varela Mosquera, Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, quien con su gran experiencia y conocimientos en el campo de la Nutrición, tema con el cual este trabajo se ha identificado, lo ha revisado y aceptado como Ponente para su presentación.

A todos los compañeros del Departamento que de alguna forma me han estimulado a culminar esta tarea.

A mi familia, a la que he restado tiempo de convivencia para poder llevar a cabo lo que me había propuesto de principio a fin.

INDICE GENERAL

I.- INTRODUCCION

I. a. AYUNO

I. a.1 . Antecedentes bibliográficos.

Christopher D. Saudek, puso de manifiesto en el Simposium celebrado en el Departamento de Medicina del Cornell University Medical Collage de New York, en el año 1974 (1), que el ser humano vive durante meses sin ingesta de calorías manteniéndose cerca del índice metabólico normal y de un cierto grado de actividad física gracias a una serie de mecanismos de adaptación, perfectamente coordinados.

La influencia de los sistemas endocrino y nervioso durante el ayuno, fueron estudiados por los autores: Genout, S.M., Goodner, C.J., Koerker, J.H., Werrbach, P.T., Toivo la en el año 1966, (2), que así mismo desarrollaron la hipótesis de que en los primeros momentos del ayuno hay una doble influencia: de un lado un decrecimiento de la concentración de insulina y de otro lado un incremento del tono simpático.

Esta hipótesis del decrecimiento de la concentración de insulina fué formulada en base a estudios realizados con infusiones de glucosa.

Igualmente hay autores que afirman que la actividad del Sistema Nervioso se incrementa durante la transición del estado saciado al de ayuno (Conway, M.J., C.J. Goodner, J.H. Werrbach and C.C. Gale, 1969) (3), probablemente respondiendo al descenso en la concentración de glucosa plasmática (Goodner, C.J., D.L. Loerker, 1973) (4). Este tema está siendo actualmente objeto de interesantes investigaciones cuyos resultados pueden modificar sustancialmente las teorías clásicas sobre la actividad simpática en el ayuno.

La pérdida de peso como manifestación externa del proceso de adaptación, es la primera observación que el ayuno pone de manifiesto y su estudio ha sido abordado por diversos autores, según se puede encontrar en la bibliografía dedicada al estudio de este proceso, y así podemos citar a Fenistein, A.R. (1959) "The measurement of success in weight reduction" (5), Grande F. "Energetica and weight reduction" (1968), (6); Cahill, G.F. Jr. (1970), "Starvation in man", (7), Sauer Georgia (1976) "Loss weight, not shirt: A Guide to Nearby Reducing Spas", (8); Rath R. (1977) "Short term fasting in treatment of obesity", (9), entre otros.

Sobre, los cambios metabólicos que el individuo manifiesta en el ayuno, han sido mucho los autores que han aportado sus trabajos para llegar a conocerlo de la forma más exacta posible. Así citaremos a Keys y col. (1950) "The Biology of human starvation", (10); Cahill, G.F. y M.G. Herrera que en 1966 publican en J. Clin. Investigation (11), "Hormone fuel, interrelationships during fasting"; Marliss, E.B.J. (1970), (12) publica en Clin. Invest. "Glucagon levels and metabolic effects in man under prolonged fasting"; Goschke, H. en 1976 (13), escribe en Klinische Wochenschrift "Metabolism in total fasting, differences between men and women normal and obese persons".

Coinciden estos autores en que uno de los papeles más destacados en los cambios metabólicos que se pueden registrar en el ayuno, es el atribuido a la lipólisis del tejido adiposo; así como se ha descrito que este tejido en algunas especies estudiadas, tiene sistemas de receptores adrenérgicos que median en la lipólisis frente a diversas condiciones, una de las cuales es el ayuno, tal como nos los describe Goodner, C.J., D. Koerker y Tarrant M.E. (1962-1973), (4 y 14) quienes usando un beta-bloqueador (Propan

nolol), sugieren un papel destacado de los mediadores beta-adrenérgicos en la regulación de la lipólisis.

No estan de acuerdo estas afirmaciones con los trabajos publicados más recientemente por Young, J.B. y Landsberg, L. (1977 y 1978), (15 y 16), en los que demuestran que el ayuno suprime la actividad simpática mientras que la ingesta de alimentos la estimula.

Por lo tanto si el ajuste fisiológico del organismo a las situaciones de ayuno consiste en una actividad simpática, obviamente la utilización de sustratos (glucogenolisis, lipólisis, etc,) típica del ayuno no puede ser explicada por la acción de las catecolaminas. Otros mecanismos como la hiperglucagonemia y el descenso de la insulinemia juegan, posiblemente, un papel primordial en dichas movilizaciones. (17).

I. a. 2.- Lipolisis en el ayuno.- Influencia hormonal.

Dentro de los importantes cambios metabólicos que se producen en el ser vivo sometido a un periodo de ayuno, para llegar a un grado óptimo de adaptación biológica, y de los que hizo una excelente revisión Grande en 1964 (18), vamos a considerar en este capítulo, como uno de los más demostrativos, el proceso de agotamiento de las reservas lipídicas del cuerpo, lo que da lugar a la aparición en sangre de un incremento de los lípidos circulantes y dentro de ellos se incrementan especialmente los ácidos grasos libres (FFA), lo que se conoce como lipolisis en el ayuno.

Tiene este fenómeno bioquímico de la lipolisis, la finalidad por un lado de suministrar la energía necesaria para la supervivencia del individuo sometido al ayuno (Starvation in man, Cahill G.F.Jr., M.D., 1970), así como es una consecuencia de la tendencia de los animales Insulino-deficientes de convertir en glucosa sanguínea todas sus fuentes metabólicas disponibles (Lehninger, pag. 571).

Donna J. Koerker y col. en 1975 (19), sugieren y luego demuestran en sus estudios sobre "Adaptación al ayuno en mandriles. I y II", que la lipolisis en el ayuno está determinada por dos sistemas glucorreguladores: uno el S.N.C. y el otro el páncreas endocrino, vía secreción de Insulina.

Llegan así mismo a distinguir dentro del proceso metabólico del ayuno un periodo llamado de transición, siendo este periodo de transición, una situación fisiológica determinada por la aparición de cambios en señales potenciales y los datos que recogen hacen consistente la hipótesis de que la glucosa actúa como una señal que determina a la vez el nivel

de la descarga Simpática y la secreción de Insulina en Páncreas endocrino.

El papel desempeñado por la glucosa como señal para el incremento de la lipólisis en el ayuno, ha sido demostrado igualmente por Goodner, C.J. y Tustison, W.A. en "Studies of substrate regulation in fasting. I. Evidence for central regulation of lipólisis by plasma glucosa mediated by the sympathetic nervous system", (20) y por Werrbach y col. en 1970 (21).

Los trabajos experimentales que indican el S.N.C. como uno de los dos sistemas glucorreguladores, vienen apoyados por el hecho de que entre sus acciones fisiológicas está la de controlar los niveles de glucosa plasmática, mediante una periodicidad circadiana que se manifiesta tanto en el periodo saciado como en el de ayuno (Robert H. Williams, fifth edition, pag. 780).

Así como actualmente hay consideraciones a favor de los glucoreceptores que perciben los niveles de glucosa circulante y que se inervan por el Sistema Simpático y Parasimpático a través del estímulo del S. adrenérgico, y siendo la caída en la glucosa plasmática la señal que desencadena la lipólisis en el estado de ayuno, ello nos lleva a mostrarnos de acuerdo con la teoría arriba expuesta.

En este sentido se describe como el Sistema Nervioso Central actúa a la vez sobre la liberación hormonal y sobre el flujo de sustratos (tales como FFA y aminoácidos), que actúan conjuntamente para controlar los niveles de Glucosa plasmática.

Estudiando con bloqueadores de los receptores beta-adre

nérgicos (por ej. propanolol), el grado de regulación del Sistema Nervioso Simpático sobre la lipólisis, Pinter y Patee (1967) (22), demuestran un cierto grado de inhibición de la lipólisis en humanos durante un largo periodo de ayuno, lo que sugiere que el S.N.C. Simpático es importante para acelerar la lipólisis durante la transición entre el estado saciado y el estado de ayuno, pero tiene menor importancia para mantenerla a lo largo de este estado.

No es posible con este método cuantificar el grado de regulación de la lipólisis por el S.N.C., debido al hecho de que otro regulador, la Insulina, también se altera (Brodie, B.B., G.Krishina y S.Hynie). (23). La caída de la Insulina que acompaña al bloqueo beta-adrenérgico se traducirá en un incremento de la lipólisis y puede enmascarar la magnitud de la regulación simpática.

Para conocer esta interferencia D.J.Koerker y W. Ruch (24), utilizan la somatostatina como inhibidor de la secreción de Insulina y Glucagón, que aparentemente no ejerce ninguna acción en la función del Sistema Nervioso Simpático, lo que permite evaluar la acción de estas dos hormonas (Koerker, D.J., Marliss, E.B.T., T. Aoki., Pinter) (25,12,22), y el sistema adrenérgico en la regulación de la lipólisis en el ayuno.

Junto a una evidente regulación nerviosa, traducida en estímulo de origen Simpático ó Parasimpático, existe una marcada influencia de factores endocrinos que afectan al metabolismo lipídico en el ayuno.

Así podemos citar a la Insulina, el Glucagón, la HGH y la ACTH como hormonas que modifican, en el sentido de anabolismo ó catabolismo, la tasa de Lípidos circulantes bajo di

versos factores de origen exógeno ó endógeno y de las que hablaré en siguientes capítulos.

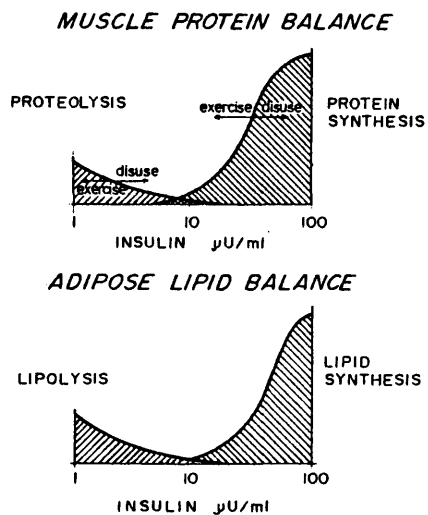
Si bien considerada y demostrada la secreción de Insulina pancreática, como uno de los sistemas glucorreguladores en el ayuno, de sobra es conocida su acción lipogenética en el hígado para lo que precisa de la glucosa en proporciones elevadas. Trás su inyección desciende la tasa de FFA, por el contrario ésta aumenta en el diabético, mientras disminuye la lipogénesis hepática, probablemente por insuficiente suministro de ATP y disminución del aporte de NADH_2 . En tal sentido tenemos los trabajos experimentales de Cuatrecasas en 1971 (26), que trabajando en receptores de membrana de los adipocitos estudia los cambios característicos que la Insulina realiza sobre la superficie celular alterando las características de la membrana, tal como: permeabilidad a la glucosa, transporte de aminoácidos ó flujo de Potasio: inhibe la lipólisis en el tejido adiposo y probablemente la lipólisis en el músculo (Fig. 1).

En cuanto a la acción desempeñada por la Insulina en la regulación de la lipólisis en el ayuno (4,9,11,13, 14,), hay gran número de autores que le dan un papel predominante y así Exton y col. (1971) (27) describen como mediante un incremento en el AMPc (a través de las catecolaminas que se liberan de la médula suprarrenal obedeciendo a concentraciones bajas de glucosa plasmática), se produce un estímulo sobre la enzima proteinkinasa, la que a su vez promueve un incremento de la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo, siendo considerada la Insulina, como una de las hormonas que bajo ciertas condiciones decrecen el nivel del AMPc y la actividad de la proteinkinasa.

En la fig. 1 se representa esquemáticamente los efectos

tos metabólicos de los niveles de Insulina sobre el tejido adiposo, tomado de Cahill, J.F. (1971) "Physiology of Insulin in Man", en donde se advierte el efecto que las distintas concentraciones de Insulina, tienen sobre el metabolismo de este tejido así como sobre las proteínas musculares.

Fig. 1



Efecto de la concentración de insulina sobre el metabolismo del músculo y tejido adiposo. Altos niveles de insulina promueven la síntesis de lípidos y su almacenamiento en el tejido adiposo, a niveles bajos se liberan ácidos grasos libres que pasan a la circulación. El mismo modelo para el músculo, con la salvedad de que éste se altera por el ejercicio aumentando el efecto de la insulina.

I. b. HOMEOSTASIS

Durante los últimos años han tenido lugar importantes avances en el estudio del tratamiento a seguir en la obesidad con resultados terapéuticos llevados a la clínica; gran cantidad de autores nos hablan de la deprivación total de alimentos como uno de los más modernos tratamientos realizados en el recinto hospitalario.

Ya en el año 1912 el profesor F.J. Benedict (Boston), hizo de éste tema su objeto de trabajo y publicó su "Study of Prolonged Fasting".

Koerker y col. en el año 1914 (USA), demostraron que durante el periodo de ayuno la falta de aporte energético externo (calorías) en el organismo vivo induce una adaptación para el mantenimiento de la vida y sus constantes fisiológicas.

Si se sigue una observación experimental en el comportamiento de un ser vivo en éstas condiciones (alejados de una rutina, necesaria para satisfacer unas determinadas demandas energéticas), lo primero que nos llama la atención es la pérdida de peso que gradualmente va experimentando durante el tiempo que se mantiene el ayuno; pero así mismo observamos como el organismo en estudio manifiesta un estado en el que hay una adecuación interna fisiológica (adaptación), puesta de manifiesto por el desencadenamiento de mecanismos homeostáticos en los que interviene el Sistema Nervioso y el Sistema endocrino, siendo la lipólisis el factor bioquímico que juega el papel más importante en el ayuno para conocer el proceso de adaptación.

El término adaptación en la Literatura biológica, se usa para describir aquellos cambios, en la estructura, función y comportamiento que se pueden detectar genéticamente, habiéndose adquirido por procesos que evolucionan durante largos periodos de tiempo (28).

Ahora bien, en Física (Richard W.Jones) se propone la palabra "ajuste" para designar aquellos cambios que se provocan bajo una prolongada alteración, entendiéndose que un ajuste tendería a desaparecer cuando se elimine la alteración que lo origina, (29).

El ajuste en Biología tiene dos aceptaciones con respecto al tiempo: Por ej.: Lo que se conoce como Aclimatación, expresa aquellos ajustes que ocurren como consecuencia de un cambio en una cualidad física del entorno, tal como aclimatación a la temperatura. De mayor amplitud es el término aclimatización que está reservado para ajustes inducidos por alguna combinación de factores ambientales (29).

La capacidad que tienen los seres vivos para responder por medio de procesos fisiológicos coordinados que restablecen un estado estacionario determina en ellos los límites de supervivencia.

Los seres vivos tienen una estructura más o menos especializada que les hace reaccionar a las variaciones del medio externo (estímulo) mediante movimientos vitales que repercuten sobre el mismo ser vivo cambiando sus relaciones iniciales con el medio (30). (Dr.Tamarit 1965).

Todas las formas de vida animal se enfrentan en mayor o menor grado a presiones ambientales, las cuales tienden a desplazar la condición fisiológica del animal de una "nor

ma ideal u óptima".

Como consecuencia de los cambios del medio externo se han perfeccionado los mecanismos encargados de mantener un estado estable debido a una evolución gradual de los seres vivos, evolución que tiene el carácter de engrandecer la finalidad de un individuo para su propio desarrollo.

El término estabilidad tiene distintos significados, en el uso corriente estabilidad denota una cierta constancia y falta de cambio o fluctuación. En un sentido más técnico estabilidad puede significar la habilidad para resistir a las alteraciones del medio sin interrupción ó pérdida permanente de la función normal.

Claudio Bernard, puntualizó que la sangre y la linfa que bañan las células de los organismos constituye el medio interno y que el organismo es un todo integrado.

Al medio interno Walter Cannon, le denominó matriz líquida que es el producto del organismo y por él controlado, y además expresó la opinión de que el organismo se libera de las alteraciones a despecho de grandes cambios en el mundo exterior, por medio de los mecanismos que mantienen la uniformidad de la matriz líquida.

Este concepto de los estados estables mantenidos en el medio interno ó matriz líquida y la importancia de la constancia de ésta matriz para la continua acción eficiente del organismo (propuesta por Cannon) se reconoce actualmente como homeostasis.

La literatura está algo confusa cuando describe los sistemas homeostáticos como estados adaptados. Sería más exacto

saber que homeostásis son adaptaciones, habiéndose adquirido por evolución (30).

Definimos pues el término de homeostásis como el conjunto de procesos fisiológicos coordinados por medio de los cuales el organismo se mantiene en un estado estacionario.

Estos procesos fisiológicos son el resultado de dos clases de respuestas, unas inmediatas y otras de efecto retardado cuya finalidad es mejorar la calidad de la regulación.

Para que ésta definición sea válida, es necesario que los organismos sean capaces de percibir un punto final al que ajustan sus activaciones.

Conceptos como regulación biológica y homeostasis, tiene gran abolengo. Los desarrollos de Greek, han sido admirablemente descritos por Adolph (1961) (31), que además discute algunas de las interpretaciones del concepto homeostático.

Posiblemente el primero que reconoce la prioridad de los procesos reguladores que ocurren en el organismo y define el concepto en términos razonables, precisos y modernos, sea el ya referido autor Claude Bernard (1865, 1878) (32;33).

Bernard forja la frase "fijeza del medio interno" y enuncia cual será la condición para una vida libre.

El paso más importante para el desarrollo de éste concepto lo hizo Cannon (1929) que concibe el término homeostasis, definido como "el conjunto de reacciones fisiológicas coordinadas que mantienen mejor el estado estacionario en el cuerpo".(34).

Ha sido el trabajo de Prigogine, premio Nobel de Química 1977, el que ha permitido dar una formulación científica coherente a las preguntas que muchos científicos se han planteado a lo largo de la Historia de la Humanidad. Cuando estudiaron los sistemas biológicos y su evolución como procesos fisicoquímicos observan que los errores y las fluctuaciones fisicoquímicas llegan a ser más relevantes que los propios valores medios, característicos de la definición de "equilibrio termodinámico", según cita Manuel G. Velarde en su Ensayo "estructuras disipativas y evolución", aparecido en el Boletín Informativo de la Fundación Juan March (Marzo-1978). (36).

Ya en 1945, Prigogine partió de que un sistema abierto podría muy bien evolucionar disminuyendo su entropía, sin por ello contradecir el 2º principio de Termodinámica, siendo preciso para ello que el intercambio de entropía con el exterior sea negativo, es decir, que si admitimos que el sistema y su exterior forman un nuevo sistema aislado, entonces el exterior se desordena -Prigogine I., Introducción a la Termodinámica de los procesos irreversibles (trad.), Seleccion Científicas-Madrid 1974. (36).

Fue el primer gran logro de Prigogine en una etapa en que si se pensaba en la real utilidad de la termodinámica, antes bien se le daba por incompatible con el entendimiento de la vida y de la evolución de los seres vivos. Hoy día algunos aspectos del crecimiento y de la evolución de los sistemas fisicoquímicos abiertos, se han entendido sin que todavía haya una teoría termodinámica bien establecida y completa y como tales sistemas abiertos consideramos al ser vivo, muy alejado por tanto del equilibrio al que pueden llegar los sistemas aislados como hasta ahora se venía demostrando con los principios de Termodinámica clásica.

Etimológicamente (homo = parecido ó similar; stasis = algo estático, inmóvil) el término no responde exactamente a la realidad de su concepto. Cannon fué consciente de que los mecanismos homeostáticos tienen carácter dinámico, continuamente modifican procesos variados, enfocados a buscar la necesidad de cambios en el organismo.

Un sistema homeostático es uno de los procesos que tiene como principal misión la regulación. La regulación biológica engloba aquellos sistemas que actúan minimizando los efectos de los factores que modifican el medio ambiente.

Desde el punto de vista físico, el estado estacionario al que Cannon alude se produce en un organismo, si los procesos individuales y el sistema completo mantienen una conducta que no debe cambiar con el tiempo; pero visto de esta manera implica una condición algo artificial, que no caracteriza a un organismo, ya que éste responde normalmente a cambios en su entorno.

El considerar en un ser vivo un estado estacionario respecto al medio que le rodea, es una consecuencia de aplicarle el concepto de ser vivo como sistema abierto, desechando las teorías mantenidas durante casi un siglo que intentan aplicar conceptos y leyes termodinámicas propias del equilibrio a los sistemas biológicos.

El concepto de estado estacionario debe distinguirse claramente del de equilibrio; en sentido termodinámico el equilibrio sólo existe cuando no hay flujo de energía o material, esto es, equivale a estado terminal ó muerte, mientras que el ser vivo está continuamente intercambiando energía y material con su medio. Podemos considerar la vida, termodinamicamente hablando, como un proceso fuertemente disipativo ó muy alejado del equilibrio.

I. b. 1.- Mecanismos homeostáticos, con especial mención del mecanismo de feed-back.

A medida que nos elevamos en la escala zoológica, los organismos han evolucionado en el sentido de perfeccionar sus sistemas de adaptación al medio externo, de tal forma que el hombre ha conseguido en gran manera ser independiente de su entorno en el sistema ecológico a que pertenece (30), siendo los mecanismos homeostáticos los medios que utilizan los organismos para realizar con relativa libertad el control de su entorno.

De las distintas formas posibles de controlar las perturbaciones de un sistema fisiológico, citaremos como de mayor interés el mecanismo de feedback.

Los sistemas homeostáticos usan ampliamente éste mecanismo a efectos de regulación ya que puede utilizarse para regular la concentración de especies químicas, nivel energético, o de posición neuromuscular, etc.

Un sistema de feedback tiene propiedades muy distintas de la de sus componentes individuales, como así se ha demostrado en observaciones experimentales difíciles de llevar a cabo en el terreno biológico. Ya éste efecto se ha podido identificar en organismos inferiores en base a reacciones bioquímicas apropiadas en ellos a través de la evolución histórica (Adolph, 1968).

La demostración de la existencia de éste mecanismo homeostático y los caminos que se sigue en los procesos de feedback se han puesto de manifiesto en los estudios realizados por Richard V. Jones (que lo enfoca desde un punto de vista físico-matemático) y publicados en su Principles of biological regulation (1973) como:

Regulación de la temperatura bajo condiciones de stress, regulación de la tiroxina; regulación de la presión sanguínea, transporte intravenoso de glucosa (37).

Dentro del mecanismo de feedback, tiene destacada importancia biológica el "servomecanismo" utilizado por los organismos para controlar las modificaciones externas a él y desencadenar reacciones fisiológicas necesarias para minimizar estas alteraciones.

Es característico de todos los servomecanismos que la respuesta global sea una propiedad de tres unidades que funcionan juntas. La unidad central puede denominarse el "controlador", que recibe la señal y la interpreta. La señal, que llega al controlador desde el detector, puede recibir el nombre de estímulo de entrada. El controlador es capaz de activar la respuesta apropiada por medio de un estímulo de salida que va a la tercera unidad (el regulador), que responde para contrarrestar el cambio que inició el estímulo de entrada. Servomecanismo básico. (De B.Bellamy (1970) Animal rhythmus. Scienza Progress, 58, 99-115) (38).

Decimos que los sistemas control de este tipo manifiestan un feedback negativo, podemos expresar pues que un feedback negativo es capaz de reducir el efecto de los disturbios del medio y así hacer decrecer la sensibilidad del sistema.

Se considera los Servomecanismos como reguladores proporcionales, ahora bien, este término no implica que las relaciones deban ser lineales.

El estudio de los mecanismos homeostáticos nos lleva a comprender cómo diversos organismos son capaces de vivir y reproducirse en condiciones adversas.

Teóricamente son tres los modos como se lleva a cabo la homeostasis:

1.- Si el cambio ambiental se puede predecir, un sistema de tiempo cronometrado podría dar una respuesta periódica a la fluctuación conocida.

2.- Las condiciones externas podrían ser valoradas y junto con el conocimiento de las propiedades del sistema de reacción podría hacerse un cálculo de la amplitud del cambio previsto. Entonces se iniciaría una respuesta apropiada que contrarrestara el cambio esperado.

3.- El interior del organismo podría recibir un aviso de modo que cualquier alejamiento excesivo de una norma actuase como señal para iniciar una respuesta, que solamente se detendría cuando se hubiera establecido el estado normal.

De los tres sistemas posibles, solamente el primero y el tercero son utilizados como mecanismos biológicos.

La presencia del primer mecanismo en ciertas actividades fisiológicas y bioquímicas está implícitamente comprendida en lo que se conoce como Ritmos Circadianos (39).

Hace mucho que se consideran fenómenos naturales los ritmos diarios ó estacionarios de actividad de los organismos como: comer, dormir, reproducirse, etc. en cambio hace relativamente poco que se estableció la naturaleza de éstos ritmos y en especial su origen interno, aunque ya Plinio (23-79 d.C.) señaló que las hojas de algunas plantas toman en la noche una posición diferente de la que tienen en el día, lo que le señala como el primer observador de éstos ritmos naturales de los seres vivos. En la actualidad siguen investigándose éstos aspectos.

tos, así como su aplicación a la Biología humana.

Durante mucho tiempo, se pensó que la alternancia natural del día o de la noche en la superficie de la tierra imponía ritmos diurnos a todos los seres vivos. Pero si el ritmo se relacionara de esta forma tan sencilla con el día y la noche, debería desaparecer cuando se coloca el organismo en un ambiente continuamente iluminado u oscuro. Fue fácil demostrar que el aislamiento de organismos diurnos en una oscuridad continua (o una luz tenue continua) no modifica el ciclo de actividad que sigue casi igual al que se observa en la Naturaleza con la importante diferencia de que su período no es exactamente de 24 horas, sino un poco más o un poco menos. Por esta razón, estos ritmos son llamados circadianos (circadías, significa próximo a un día), este nombre fue propuesto por Halberg (Halberg y Howard 1958, Aschoff 1965) y aceptado casi unánimemente.

Así si se mantiene a ratas en oscuridad continua, sigue manifestando la periodicidad del sueño, indicando con esto que existe un mecanismo interno de control de tiempo, el cual regula el comportamiento en orden a adaptarse a la longitud del día que ha existido desde que iniciaron su evolución.

El tercer tipo de sistema control actúa sin información de las condiciones externas y se ha probado que es un mecanismo de adaptación de gran importancia, mediante el cual los organismos toleran un ambiente cambiante (40).

Los cambios ambientales puede ser de naturaleza diversa, siendo detectados en último término como alteraciones en la composición química del cuerpo y estas alteraciones químicas son los señales finales a las que responden las células.

Uno de los cambios ambientales regulados por éste tercer mecanismo, es la falta de aporte energético en forma de alimentos (ayuno), y ante ésta modificación el organismo es capaz de producir un cambio general que afecta a todas sus células siendo la señal final los cambios químicos que estas experimentan.

I. c.- HOMEOSTASIS EN EL AYUNO

Siendo el ayuno un estado que se caracteriza fundamentalmente por la puesta en marcha en los individuos sometidos a él, de una serie de mecanismos fisiológicos destinados a conseguir una disminución de las alteraciones metabólicas que lleva consigo; todo lo expuesto en el capítulo anterior es totalmente puesto en práctica por el organismo cuando se encuentra en esta situación de privación de aporte energético externo y así: en primer lugar se desencadenan los mecanismos homeostáticos destinados a mantener la normoglucemia, ya que según nos demuestran gran cantidad de estudios experimentales recogidos en la bibliografía, este estado se asocia con una hipoglucemia del ayuno, lo que ha sido recogido por autores como Merimee, T.B. y col. (1974), (41); Stefan S.Fajans y col. (1976), (42), entre otros, que exponen una detallada relación de los mecanismos bioquímicos que se activan en la homeostasis de la glucemia en esta hipoglucemia del ayuno.

En segundo lugar, es la pérdida de peso que el individuo experimenta, la manifestación externa de este proceso homeostático a expensas del tejido adiposo y muscular, así como del agua ligada a los iones Na. (en los primeros estadios del proceso de adaptación). Pero esa pérdida se detiene debido a los cambios adaptativos que se producen en la utilización de energía a consecuencia de la propia restricción calórica (43).

Entre los mecanismos bioquímicos destinados a mantener la normoglucemia en el ayuno, citaremos el proceso de hidrólisis del glucógeno, conocido como glucogenolisis, como uno de los que se ponen en marcha de forma inmediata y del que

nos habla Curnow, R.T.: "Starvation on hepatic glycogen metabolism and glucose " (44), y Fisher, M., Sherwin R.S. Hendler et al.: "Kinetics of glucagon in man: effects of Starvation" (1976) (45).

Desde el punto de vista hormonal, es obligado destacar que en este mantenimiento homeostático de la glucemia en el ayuno, son las dos hormonas del páncreas endocrino: insulina y glucagón, las que mediante una secreción coordinada y por la acción biológica derivada de esta coordinación man tienen niveles normales de glucosa sanguínea en el estado de ayuno y la razón ó cociente de ambas nos referiremos a continuación con más detalle.

Felig y Wahren (1975) (46), demuestran que al producirse una deplección de glucógeno hepático después de 12 horas de ayuno, la glucosa necesaria para la función cerebral procede de la gluconeogénesis a partir de los aminoácidos musculares, de aquí que sea la gluconeogénesis, inducida por diversos sustratos como aminoácidos, lactato, piruvato, glicerol y controlado por diversas hormonas como la insulina, cortisol, glucagón y hormona del crecimiento, otro de los mecanismos homeostáticos del ayuno, tal como se recoge en un estudio de Exton (1966) (47), que utiliza como modelo experimental el hígado perfundido y que más recientemente (1972), publica sobre este mismo tema otro trabajo con lo que nos lo confirma, y en el que se describe los cambios metabólicos que se producen en el hígado para que comience la gluconeogéne^ssis, como es la observación experimental de que se disminuye la actividad de la glucocinasa y aumenta la del enzima opuesto, la glucosa-6-fosfatasa, así como la de que el glicerol procedente de la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo es utilizado para la gluconeogénesis en el hígado. (48).

Respecto a la pérdida de peso, dice Cahill (49), que durante la fase de gluconeogénesis se pueden perder diariamente hasta 450 g. de músculo, además de 150-250 gramos de grasa, lo que hace que la pérdida total de tejido sea de 450 a 700 g. y que incluso en aquellos individuos que no hayan sido sometidos previamente a una restricción de la ingesta de hidratos de carbono, la pérdida total de peso es mucho mayor debido a la diuresis salina y así sugiere De Franco y col. (1975), (50), y Spark y col. (1975) (51), que puede estar relacionado este hecho con un aumento del índice glucagón/insulina.

J. Runcil y T.H. Hilditch (1974), (52), trabajando experimentalmente con 76 pacientes obesos a los que somete a un periodo prolongado de ayuno (más de 14 días), y en los que controla diariamente : peso, la excreción urinaria de K, el N. ureico y la glucemia, demuestra que la pérdida de peso es un efecto complejo que resulta de la pérdida de tejido muscular, utilización del tejido adiposo y eliminación de 3 a 5 litros de líquido corporal.

Cuando el ayuno supera los 14 días, la pérdida de peso decrece, pero se mantiene virtualmente a expensas del catabolismo del tejido muscular y graso.

I. c.1 .-Producción de glucosa en situaciones fisiológicas.

I.c.1.a.-Glucogenolisis.

Como uno de los mecanismos fisiológicos capaz de liberar glucosa al torrente sanguíneo, consiste en la desintegración del glucógeno, lo que se conoce como glucogenolisis, hemos de considerar su importancia dentro del proceso experimental que nos ocupa.

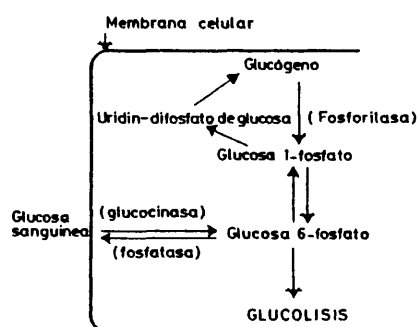
Bien es sabido, que las reservas animales de glucógeno (tanto muscular como hepático), son muy limitadas, así el hígado almacena de un 5 a un 8 por ciento de su peso y los músculos un uno por ciento, pues bien, aún así este polímero es utilizado mediante un proceso de hidrólisis catalizado por una fosforilasa capaz de romper la molécula de glucógeno cuando es necesario incrementar los niveles de glucosa plasmática circulante.

Como en reposo la fosforilasa se encuentra inactiva, se hace necesario, cuando así se requiere, activarla antes de poder obtener glucosa del glucógeno, lo que a su vez dependería una de la adrenalina y del glucagón. (Fig. 2). Como una vez formada la glucosa, ésta puede atravesar las células hepáticas debido a que poseen en su pared celular fosfatasas capaces de escindir la glucosa-6-P con producción de glucosa libre que ya puede atravesar la membrana y volver a los líquidos extracelulares, con lo que se produce un aumento inmediato de su concentración en sangre. Particularmente en el músculo, se sabe que la glucosa-6-P no puede defosforilarse, con lo que la glucosa de esta procedencia no puede pasar al torrente sanguíneo.

La intervención del glucagón en la glucogenolisis he

pática en el ayuno, ha sido estudiado por David E. Goldstein, en dos trabajos publicados en el año 1978 (53,54), en los que somete a administración continua intravenosa de glucagón (50 ug/Kg) a tres grupos de ratas, un grupo saciadas, otro ayunadas durante 24 h. y el tercero mantenido en ayunas durante 72 h., observándose diferencias significativas en los enzimas responsables de la síntesis o degradación del glucagón (sintetasa y fosforilasa respectivamente), así en el primer grupo se presenta una rápida actividad de la fosforilasa pero no cambia la de la sintetasa; en el 2º grupo (corto tiempo de ayuno), se demostró una coordinación entre la inactivación de la sintetasa y la activación de la fosforilasa y en las ayunadas 72 h. se presentó una rápida inactivación de la sintetasa pero no una activación significativa de la fosforilasa, así como observan que la respuesta del AMPc hepático fué de mayor magnitud en las ratas ayunadas, de este modo proponen que el mecanismo enzimático de la intervención del glucagón, en la glicogénesis hepática, en ratas comida y ayunadas es distinto.

Fig. 2



Reacciones químicas de la glucogénesis y la glucogenólisis, e interconversiones de glucosa sanguínea y glucógeno hepático.

El segundo trabajo nos demuestra que la concentración de glucógeno hepático alcanza muy bajos niveles, pero aumenta extraordinariamente hasta aproximadamente un 25 % de los niveles normales (sin ayuno), tal incremento se considera de importancia en la homeostasis de la glucemia y la rápida movilización de energía durante un prolongado ayuno. La reacumulación de glucógeno, que se sabe puede producirse a expensas de compuestos más pequeños como el ácido láctico, glicerol, ácido pirúvico y algunos aminoácidos desaminados se asocian con cambios en la sintetasa hepática y en la actividad de la fosforilasa.

I. a. 1. b.- El cociente glucagón/insulina.

Puesto que son los niveles de glucosa plasmática las señales que desencadenan el proceso homeostático en el ayuno, vamos a estudiar la interrelación glucagón/insulina que es quizás la que posee mayor número de observaciones y base experimental para valorar su importancia fisiológica en el mantenimiento de la glucemia.

El cociente glucagón/insulina destaca por la importancia fisiológica en la producción de glucosa en el hígado.

Es difícil poder comprender de forma aislada el papel fisiológico del glucagón y su mecanismo de acción, ya que simultáneamente posee efectos liberadores de aminas simpático-miméticas (55), ó sobre la secreción de insulina.

Por otro lado, la inducción de hipoglucemia insulínica (56), y los corticoides son estimulantes a su vez de la secreción de glucagón.

La doble acción del glucagón como hormona capaz de estimular la producción de glucosa en el hígado, está basada en dos acciones: la glucogenólisis y la gluconeogénesis.

Miller (57), utilizó una preparación de hígado aislado y perfundido como modelo experimental para estudiar el papel regulador del glucagón sobre la gluconeogénesis hepática a partir de diversos sustratos.

Sutherland (58), observa el papel del AMP-cíclico como mediador del efecto glucogenolítico del glucagón y del papel de éste nucleótido como segundo mensajero del efecto

hormonal; todo lo cual enmascaró la importante acción gluconeogénica de ésta hormona.

Cuando existe una situación en la que hay una mayor demanda de glucosa por aquellos tejidos que la utilizan como fuente de energía primordial, la gluconeogénesis hepática se ve consiguientemente incrementada, dando lugar a cambios en los niveles circulantes de insulina y glucagón. De éste tipo de situación es un ejemplo el ayuno y el ejercicio continuo, situaciones características por la movilización de sustrato endógeno (59,60,61,62).

En cuanto a la otra hormona, la insulina, son muy variados sus efectos sobre el hígado, pero es su acción glucogénica la que mantiene el equilibrio en la producción de glucosa plasmática frente a la acción glucogenolítica del glucagón.

Prevalecen dos criterios de interpretación del mecanismo por el cual tienen lugar las variaciones de los niveles hormonales pero no está totalmente aclarados sobre su modo de ser.

Para Hunger y col., (63), es muy importante el papel regulador de los niveles de glucosa en contacto con las células insulares, es decir, según la cuantía de las concentraciones de glucosa plasmática se produce un cambio simultáneo y de sentido opuesto en la liberación de ambas hormonas.

Serían pues dos sistemas independientes reguladores de la concentración de glucosa.

Para Samols (64,65), serían dos sistemas independientes, pues la liberación de insulina estaría estrechamente controlada por las variaciones en la concentración de glucagón próximas a la célula beta y a su vez la insulina ejercería

un control directo sobre la liberación de glucagón almacenado en las células alfa.

Situaciones fisiológicas de disminución del aporte energético al organismo (ayuno), o de mayor consumo de sustratos energéticos (ejercicio muscular), van invariablemente acompañadas de un aumento de la relación glucagón/insulina del plasma, por el contrario en situaciones con abundancia de combustible, éste cociente está disminuido.

Con la determinación de éste cociente lo que hacemos es conocer las situaciones anabólicas y catabólicas de un sistema fisiológico, interpretándose como la mejor forma de dirigir la combustión orgánica en uno u otro sentido.

I. c.l.c. Gluconeogénesis.

La gluconeogénesis es el segundo mecanismo que utiliza el hígado en la regulación de la glucosa sanguínea, puesto que es el órgano en el que se verifica ésta función con mayor efectividad; en menor escala también el riñón posee capacidad para formar glucosa a partir de productos intermedios del metabolismo glucídico e incluso de aminoácidos.

Los precursores más importantes para la formación de glucosa en el hígado son el glicerol, los aminoácidos, el lactato y el piruvato.

Los experimentos realizados por Exton J.H. (1970) (66) con hígado de rata perfundido demuestran que un incremento en la concentración plasmática de algunos de estos precursores pueden estimular la gluconeogénesis, así por ejemplo, con concentraciones de glicerol de 0,5 mM. se obtiene el mayor estímulo gluconeogénico, el nivel plasmático de glicerol en animales alimentados es de 0,1 mM. y esta concentración se duplica durante el ayuno.

No hay una clara evidencia de que el nivel plasmático de aminoácidos esté aumentado en el ayuno, sin embargo el aumento de sustrato disponible para la gluconeogénesis podría también elevarse por un estímulo del transporte de aminoácidos dentro del hepatocito.

Conocemos actualmente que éste transporte está influido por hormonas como el glucagón, que sabemos estimula el transporte de alanina (Mallette y col., 1969) (67,68), aunque no está bien estudiado que esta hormona estimule el transporte de todos los aminoácidos.

En el estado de ayuno, la disponibilidad de precursores gluconeogénicos, glicerol y aminoácidos, están incrementados como consecuencia de los efectos de las hormonas lipolíticas y los glucocorticoides. Las hormonas lipolíticas aumentan la liberación de glicerol desde el tejido adiposo. Los glucocorticoides aumentan el catabolismo de las proteínas en general. La disminución de los niveles de insulina plasmática, produce un efecto semejante en estos procesos. (63).

Los cambios en las concentraciones de insulina y glucagón que tiene lugar, pueden llegar a elevarse hasta en un 60% el contenido en AMP-cíclico en el hígado de los animales en ayunas (Exton y Park. 1967) (70), estos autores explican que la elevación de AMP-cíclico es un importante estímulo de la gluconeogénesis a nivel de la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato (glicolisis). La evidencia de estas ideas están apoyadas en el hecho experimental llevado a cabo por dichos autores de que incorporando al lactato un átomo marcado con C^{14} , este se detecta en la glucosa 40 segundos después de añadir glucagón al medio de perfusión en el que se encuentra el hígado. La concentración de glucagón que estimula al máximo la gluconeogénesis es la misma que la que estimula la glucogenólisis y adenil ciclasa. La adición de AMP-cíclico a la perfusión de un hígado de rata aislado estimula la gluconeogénesis (midiéndolo por el tiempo de incorporación del C^{14} del Lactato marcado dentro de la molécula de glucosa).

Los aminoácidos precursores en la gluconeogénesis durante el estado de ayuno se obtienen de las proteínas tisulares. Cahill observa (1970) (71), la liberación aumentada de aminoácidos musculares en el ayuno y su posterior captación por el hígado. Este catabolismo está aumentado durante el estado de ayuno, pudiendo actuar como responsables los cambios en los

niveles circulantes de glucocorticoides e insulina. Los primero aumentan el metabolismo de las moléculas proteicas en general y el decrecimiento de los niveles de insulina que se ha demostrado tienen lugar, poseen un efecto similar.

El lactato y el piruvato provendrían de la glucolisis, fundamentalmente muscular. De ésta forma los residuos de la oxidación incompleta de la glucosa en los tejidos primordialmente glicolíticos volverían al hígado para aprovecharse en la síntesis de nuevas moléculas de glucosa (Ciclo de Cori).

La síntesis neta de glucosa a partir del lactato sanguíneo, que tiene lugar principalmente en el hígado, es un proceso muy activo en los animales superiores.

Se ha estudiado la posibilidad de que el lactato pueda producir cambios dentro del hígado (a través de una acción enzimática), que pueden estimular la gluconeogénesis. La administración de lactato demuestra Start (1969) (72) que aumenta el contenido de citrato en el hígado.

I. c. 2. Lipólisis del tejido adiposo.

Un tercer mecanismo que mantiene la homeostasis de la glucosa en condiciones adversas es la lipólisis que tiene lugar en el Tejido adiposo.

El Tejido adiposo es un tejido altamente especializado. Está formado de agregados de células esféricas, cuya característica más importante es el estar formadas únicamente por una gotita de grasa que en el estado saciado ocupa la mayor parte del citoplasma celular. El reducido núcleo está situado en la estrecha banda plana que hay alrededor del citoplasma, de forma excéntrica.

Estas células lipídicas, aún cuando están distribuidas por muchas partes del cuerpo, tienden a concentrarse en ciertas regiones, por ejemplo, debajo de la piel (tejido adiposo subcutáneo), y alrededor de los órganos internos (corazón, riñones). La cantidad de tejido adiposo subcutáneo varía considerablemente de unas a otras especies (y aún dentro de individuos de la misma especie con su dieta alimenticia) pero es, aproximadamente, inversamente proporcional al contenido muscular.

El tejido adiposo fué reconocido como un tejido rico en lípidos desde hace bastantes años, pero sólo hasta 1930 no se reconoce de forma general que consiste en tejido conectivo en el que se depositan las gotitas de grasa, considerándose sin embargo inerte desde el punto de vista metabólico. Durante los siguientes 20 años comienza a acumularse las evidencias que sugieren que por el contrario, el tejido es metabólicamente activo y tiene un papel muy especializado en la homeostasis calórica del animal, ésta evidencia fué com

parada y descrita en un análisis realizado por Wertheimer y Shapiro en 1948 (73).

Los estudios de Haoserberger demuestran que las células del tejido adiposo no procede de tejido conectivo, ya que procede de primitivas células grasas. El estudio microscópico de éste tejido, demuestra que posee un refuerzo de nervios y capilares. Así mismo, los experimentos bioquímicos demuestran que el tejido adiposo no sólo es capaz de captar las grasas desde la sangre, sino también de liberarlas (en forma ácidos grasos) dentro del torrente circulatorio. Por otra parte, la movilización de las grasas no depende sólo de su concentración en sangre, sino de un control nervioso y hormonal.

Los estudios de Schoenheimer y Rittenberg 1935, demuestran sin embargo, que la cantidad total de depósito graso puede permanecer constante, ya que está siendo constantemente sintetizada y degradada.

Fueron Gordon, R.S., Jr., y Dole V.P. en 1956 (74,75), los que demuestran que los ácidos grasos son la mejor forma de transporte de lípidos del tejido adiposo y un sustrato rápidamente utilizado por el hígado, músculo y algún otro tejido.

El tejido adiposo contribuye a la homeostasis metabólica que ocurre en el periodo de ayuno, en cuanto es el tejido que almacena los ácidos grasos que se van a liberar a la sangre cuando la falta de aporte externo de alimentos deje de contribuir al mantenimiento de la concentración de glucosa necesaria para continuar la actividad vital.

Los ácidos grasos se encuentran en el tejido adiposo en

forma de grasas neutras (triglicéridos), siendo un proceso de hidrólisis activado enzimáticamente, el que los libera en la circulación sanguínea para su posterior aprovechamiento por otros tejidos (lipólisis).

La lipólisis es pues un fenómeno hidrolítico catalizado por enzimas (triglicérido, diglicérido y monoglicérido lipasas), capaz de liberar el torrente circulatorio ácidos grasos, que se transportan unidos a la fracción albúmina de las proteínas plasmáticas.

Así mismo en esta acción lipolítica intervienen influencias hormonales.

Sentada la evidencia de que el estado de ayuno es una situación fisiológica en la que hay un incremento en la movilización de ácidos grasos (demostrado in vivo e in vitro), podría explicarse este efecto lipolítico, simplemente por un decrecimiento en la esterificación debida a concentraciones de insulina plasmática inferiores a los valores hallados como basales (76). Carlson, L.A.

Pero así mismo varias hormonas se han podido identificar en este estímulo lipolítico como reguladoras del control metabólico en el estado de ayuno, tales como la hormona de crecimiento, Glucagón, Insulina, Cortisol y Catecolaminas (Cahill, G.F., M.G.Herrera, Doona, J., Koerker) (11,19).

Marcks, W.N. y Hawort (77), demuestran el incremento de los niveles de hormona de crecimiento plasmática en el ayuno. Inyectando extracto de pituitaria anterior, se incrementa la oxidación de las grasas y su metabolismo se semeja al de un animal en estado de ayuno (Roth, J., Glick, S.M.) (78). Desde 1950 el factor presente en extractos de pituitaria con

acción lipolítica se identifica como Hormona de crecimiento y ya entonces se sugiere que podría estar incrementada durante el ayuno. La medida del nivel plasmático de Hormona de crecimiento, fué posible por el desarrollo de técnicas radioinmunitológicas (RIA), demostrándose que está elevada en personas sometidas a un periodo de ayuno y se reducen sus niveles plasmáticos inmediatamente, cuando se vuelve a comer. Daughaday, W. H. . . .

El incremento del glucagón pancreático, referido en las experiencias de Marliss, E.B.T.T. Aoki (52) y la influencia que en su liberación desempeña el Sistema nervioso adrenérgico descrito por Walter, R.M. y J.P. Palmer (79), nos habla de que el efecto de ésta hormona lipolítica es similar al de las catecolaminas: incrementa el AMP-cíclico contenido en el tejido adiposo, por la vía de estimulación de la actividad adenil ciclasa (Birnbaumer, L. Rodbell, M.) (53).

El glucagón origina así mismo una activación de la fosforilasa hepática y el consiguiente incremento glucogenolítico eleva el nivel sanguíneo de glucosa, lo cual minimiza el incremento plasmático de los niveles de ácidos grasos.

Tanto el glucagón como la epinefrina (hormona catecolamínica secretada al torrente circulatorio por la médula adrenal durante un stress fisiológico), ejercen sus efectos característicos sobre las secuencias enzimáticas que se establecen entre la glucosa-1-fosfato y el glucógeno.

Inyecciones de glucagón, causan en el hombre un declinamiento transitorio del nivel de los ácidos grasos, elevándose a continuación. Ahora bien, parece ser que bajo ciertas condiciones fisiológicas, el glucagón estimula la movilización de ácidos grasos "in vivo", éste es el efecto al que

se atribuye gran valor en el estado de adaptación a las condiciones metabólicas del ayuno. Así, lo demuestra Lawrence 1966 (80) que encuentra niveles elevados, de glucagón plasmático en humanos sometidos al ayuno. Es posible pues sugerir, que estos efectos del glucagón sobre la glucogenolisis y lipolisis durante este periodo metabólico puede ser la causa inicial de la movilización de glucógeno hepático, pues se sabe que no ejerce estos efectos sobre el glucógeno muscular.

En cuanto a otra hormona que interviene en la lipolisis, la Insulina, su efecto es inmovilizar los ácidos grasos, lo que puede explicarse de forma sencilla por una acción estimulante de la esterificación de las grasas. Sin embargo, se ha podido demostrar un efecto antilipolítico directo de la Insulina en el ayuno por los estudios experimentales realizados por Havel, R.J. (1965) (81). El acusado decrecimiento de los niveles plasmáticos de insulina en el periodo de adaptación al ayuno puede permitir ejercer su efecto en la lipolisis a las hormonas lipolíticas en el periodo de transición al ayuno.

La observación de que la Insulina inhibe la lipolisis en el tejido adiposo de ratas en ayuno durante dos días o más, lo ha hecho consistente los experimentos de Scow (1970) (82). Recientemente se ha demostrado que la Insulina estimula la enzima fosfodiesterasa en el tejido adiposo (Loten, E. G.) (83), mediante un decrecimiento en la concentración de AMP-cíclico de este tejido.

Refiriéndose al Cortisol plasmático como hormona lipolítica, se ha evidenciado, con toda claridad, que primates y animales superiores durante el periodo de ayuno sufren una elevación en la concentración de los glucocorticoides circulantes. Mc. New J.J.I.M. Sabbat (1972) (84).

Randle, P.J. (85), ha demostrado experimentalmente que la presencia de ácidos grasos o cuerpos cetónicos, a las concentraciones encontradas en el plasma durante el ayuno, inhiben la utilización de glucosa por el músculo "in vitro".

Este experimento sienta las bases para el concepto del ciclo glucosa/ácidos grasos que explica el hecho de que los cambios en los niveles plasmáticos de glucosa y ácidos grasos se relacionan entre sí para suministrar a la homeostasis del ayuno un mecanismo de control.

Este mecanismo de feedback aporta el equilibrio necesario al hecho de que cuando la concentración de glucosa plasmática disminuye, los ácidos grasos se liberan del tejido adiposo, siendo su aumento en el plasma la señal para su posterior oxidación por el músculo con lo que se ahorra la utilización de glucosa y ésta queda disponible para que la aprovechen los tejidos (cerebro, nervios y hematíes), que dependen de la glucosa como combustible para su actividad.

De todo lo expuesto, podemos decir que son dos los caminos que sigue la lipólisis para coadyuvar al mantenimiento homeostático de la glucosa en el estado de ayuno; de una parte los productos de la hidrólisis de los triglicéridos (lípidos de reserva), proveen a la sangre de glicerol y ácidos grasos libres; el primero de gran importancia como precursor en el mecanismo de la gluconeogénesis, los segundos son a su vez capaces de oxidarse hasta acetil-CoA, entrando así en el ciclo tricarboxílico.

De otra parte la oxidación de los ácidos grasos libres constituye un importante ahorro de glucosa, pues ésta se reserva sólo para aquellos tejidos que dependen de la glucosa como combustible.

I. d. CONSUMO DE ENERGIA

Todos los seres vivos tienen tres necesidades fundamentales: energía (en forma de ATP), poder reductor (NADPH) y sus tratos metabólicos para la biosíntesis.

El aporte de energía que se requiere para el desarrollo y mantenimiento de un ser vivo es distinto ya sea un organismo autótrofo o heterótrofo.

La distinción metabólica fundamental entre los organismos (autótrofos y heterótrofos) se refieren a la forma en que se satisfacen sus necesidades energéticas. Los organismos autótrofos la obtienen de los componentes inorgánicos de su medio ambiente sin recurrir a los compuestos producidos por otros organismos, así todos sus compuestos carbonados pueden sintetizarlos a partir de un único compuesto inorgánico de Carbono: el anhídrido carbónico.

Diferentes especies de organismos quimioautótrofos pueden obtener su poder reductor por oxidación de gran variedad de sustancias tales como el Hidrógeno y compuestos reducidos de Azufre y Nitrógeno.

Todos los compuestos que se reducen dentro de la célula viva aportan electrones para la regeneración de ATP, mediante el transporte electrónico en la cadena de la fosforilación oxidativa.

Ordinariamente los organismos heterótrofos dependen de compuestos orgánicos preformados (alimentos) para cubrir las tres necesidades primordiales (ATP, NADPH y síntesis).

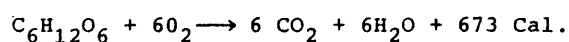
I. d. 1. Rendimiento energético de Glúcidos, Lípidos y Proteínas.

Este aporte energético es el resultado de la transformación química de los tres principios inmediatos: glúcidos, lípidos y proteínas, aportados desde el exterior del organismo con la alimentación.

El aporte calórico de cada uno de estos tres principios inmediatos viene condicionado a su oxidación total, y fué La voissier mediante la experimentación y el razonamiento quien postuló que el Carbono y el Hidrógeno de los alimentos se oxidan en el organismo por acción del O_2 y que durante este proceso se produce además de calor CO_2 y H_2O .

Se define el cociente respiratoria (CR) como la relación entre el volumen de CO_2 producido y el volumen de O_2 consumido en el mismo periodo de tiempo.

Aplicando esta definición a la glucosa por ejemplo podemos escribir:



de cuya expresión se deduce que

$$CR_{\text{glucosa}} = \frac{6 CO_2}{6 O_2} = 1$$

las 673 Cal. halladas para la glucosa se han obtenido en la combustión total de 1 molécula de Glucosa en un calorímetro y coincide con el valor calculado.

En el caso de las grasas varía un poco este índice (calculado y real) ya que depende de la composición en ácidos grasos, así para una grasa teórica con dos moléculas de ácido esteárico y una molécula de ácido palmítico se ha encontrado un CR de 0,701; El CR para la trioleína es de 0,710 y el de la Tripalmitina de 0,703.

No fué fácil obtener el CR correspondiente a la oxidación de las proteínas, ya que no es posible desarrollar una ecuación exacta de la oxidación de una molécula de proteína en el organismo. Sin embargo ya en el año 1928 Loewy calculó el CR de las proteínas (0,801) a partir de datos experimentales, deduciendo el O_2 y el H_2 que se convierte en agua intracelular.

La oxidación biológica de los tres principios inmediatos se origina por medio de una serie de sistemas redox, dispuestos de una forma totalmente ordenada en el interior de las mitocondrias celulares. Los sistemas redox, que prácticamente no varían sea cualquiera el metabolito del que se toma el H_2 por acción de la deshidrogenasa específica inicial, se conoce como "cadena de transporte electrónico" que incluye una serie de transportadores o aceptores de protones y electrones junto con el sistema terminal $1/2 O_2$ que termina en la formación de H_2O el transporte de H_2 .

1. d. 2. Unidades básicas de energía biológica.

En el trasiego de energía de los organismos vivos, los compuestos derivados del P desempeñan un papel de primera importancia; la sustancia conocida como ATP es la unidad básica de energía en los seres vivos.

Hardin y Young¹⁹³², fueron los primeros que señalaron la importancia de los fosfatos orgánicos en el metabolismo.

Aunque perfectamente conocida la estructura del ATP, vamos a recordarla brevemente: tres radicales fosfatos se hallan conjugados con el nucleósido adenosina por el Carbono en 5 de la Ribosa ciclada.

La eliminación progresiva de los fosfatos terminales produce en primer lugar ADP, luego en una segunda hidrólisis AMP y por último en una hidrólisis total la adenosina.

Un punto importante en la separación de los tres radicales fosfato es que la energía de la hidrólisis varía según cual de ellos se separa. Utilizando la ecuación de termodinámica:

$$\Delta F^{\circ} = - RT \ln K$$

aplicada a la hidrólisis del ATP se puede llegar a conocer la variación de energía libre que se produce cuando uno de los enlaces P se hidroliza; así se ha podido llegar a conocer (Lehninger) que el valor de G° para la reacción:



es de $\Delta F^{\circ} = -7,30 \text{ Kcal. a } \text{Ph} = 7 \text{ y } t^{\circ} = 37^{\circ}\text{C.}$ En principio la

gran variación de energía libre standard de la hidrólisis del ATP que no puede medirse con exactitud se descompone en una serie de etapas mediante las cuales puede medirse con más facilidad.

Esta energía libre así calculada es válida para los dos radicales terminales, mientras que en la hidrólisis del fosfato próximo a la Adenosina sólo arroja -4 Kcal. (86).

Entre las muchas explicaciones que sobre las diferencias de energía desprendida en la hidrólisis del ATP se han formulado, la de mayor aceptación es aquella que habla en el sentido de que los productos ADP y PO_4H^- pueden existir con más formas de resonancia que los productos reactivos ATP y H_2O .

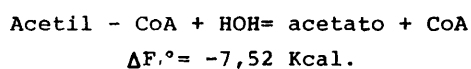
Durante los procesos de oxidación de los alimentos, más de la mitad de la energía total liberada es ~~transformada~~ en energía libre y ATP.

La máxima energía química almacenada en la molécula de ATP puede ser disponible para sintetizar otros compuestos de alta energía necesarios para las reacciones biológicas o utilizarse para desarrollar trabajos inherentes a las contracciones musculares, mantenimiento de la temperatura, etc.

Lipmann y col. (1947-50) (87), hallan la existencia de un coenzima termoestable, en muchas reacciones enzimáticas en las que tiene lugar la transferencia de grupos acetilo (debido a este descubrimiento recibió el Premio Nobel, años atrás, al hallar uno de los más importantes productos en el metabolismo intermediario: el acetil-CoA).

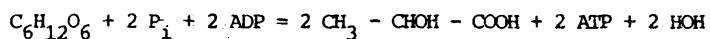
Aislaron y determinaron la estructura del acetil-CoA, que posteriormente fué comprobada por síntesis. El acetil-CoA

actúa como transportador de grupos acilo, efectuando una función análoga a la que desempeña el ATP como transportador de grupos fosfato. El enlace tioéster es un enlace de elevado contenido energético, es decir, posee una energía libre estándar de hidrólisis fuertemente negativa, según la reacción:

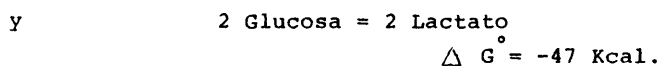
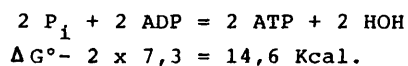


Estas dos moléculas (de gran capacidad energética) ATP y acetil-CoA son las que se producen en mayor cuantía en un ser vivo para el almacenamiento y producción de energía y las obtiene por dos vías principales: la vía glicolítica y la oxidación de los ácidos grasos.

La glicolisis es un mecanismo por el que se escinde la molécula de glucosa (de seis átomos de carbono) en dos moléculas de ácido láctico como producto final según la ecuación estequiométrica:



Para analizar la producción energética de la glicolisis, descomponemos la anterior ecuación de la forma:



de donde $-47 \text{ Kcal.} + 14,6 \text{ Kcal.} = -32 \text{ Kcal.}$

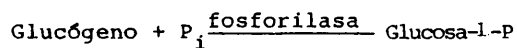
Se deducen de los datos obtenidos en la energía libre, que la transformación de glucosa en lactato proporciona energía más que suficiente para producir la fosforilación de 2 moles de ADP a ATP.

Y ya que

$$\frac{14,6}{47} \times 100 = 31$$

el 31% aproximadamente de la disminución de energía libre que se produce durante la conversión de la glucosa a lactato, se conserva en forma de energía de enlace fosfato en el ATP.

Pero la glucosa que se oxida en la glicolisis puede proceder tanto del aporte externo (alimentación rica en hidrocarbonados) como de la hidrolisis del pool de glucógeno almacenado en el hígado (glucogenolisis), siendo el rendimiento energético en este último caso de la forma siguiente:



con lo que la acción de la fosforilasa hepática evita el gasto de un mol. de ATP que es el utilizado (cuando el sustrato es la glucosa) en producir el ester fosfórico con lo que la ganancia neta es en este caso de 3 moles de ATP.

$$\Delta G^\circ = 3 \times 7,3 = 21,9 \text{ Kcal.}$$

El metabolismo completo de las grasas en el organismo lleva finalmente a la oxidación de una mol de grasa en CO₂ y H₂O y la liberación de energía equivalente a 9 cal/gramo de grasa.

El metabolismo de las grasas entraña una serie de procesos sucesivos que llegan a la producción final de glicerol y ácidos grasos libres.

El glicerol se metaboliza en la vía de los hidratos de carbono y los ácidos grasos libres, se desdoblan en unidades

de los átomos de carbono por el proceso de la beta oxidación.

Aplicando la beta-oxidación a una mol. de ácido palmítico, su producción energética se podría resumir en las siguientes fases:

	mol. de ATP
1. Palmítico ——— palmitoil CoA ———	+ 1
2. Palmitoil CoA — 8 Acetil-CoA ———	- 35
3. 8 Acetil-CoA — 16 CO ₂ -8H ₂ O-8CoA SH ———	- 96
	<hr/>
	-130

de forma global podemos escribir:

Ac. palmítico + 130 ADP + 130 P_i = 16 CO₂ + 130 ATP + 148 H₂O
cuando se oxida el ácido palmítico la cantidad de energía libre formada es:

$$\Delta G^{\circ} = - 2.340 \text{ Kcal.}$$

Si utilizamos el valor de -7,0 Kcal. para la energía libre de hidrólisis del ATP a ADP más fósforo inorgánico, la formación de 130 ATP por la oxidación biológica del palmito produce:

$$130 \times 7 = 910 \text{ Kcal.}$$

representando el almacenamiento de 910/2340 ó 39% de la energía utilizable.

El metabolismo de las proteínas se reduce esencialmente en su aspecto catabólico a la utilización con fines de producción de energía de las cadenas carbonadas de los aminoácidos y la eliminación, por diferentes vías, del nitrógeno amoniacal.

cal procedente de los grupos amino. Gilbarg C. (88) (1961).
"Metabolism of aminoacids". Ann. REv. Biochem.

Por otra parte de antiguo es sabido que la administra
ción de ciertos aminoácidos a animales diabéticos, dan lu
gar a la excreción urinaria de glucosa; los mismos aminoáci
dos administrados a animales sometidos a ayuno prolongado,
producen neogénesis de glucógeno. Estos aminoácidos se deno
minan glucogénicos o gluconeogénicos.

I. e. REDUCCION DE PESO

La decepción que experimenta el paciente obeso que intenta perder peso, se pone de manifiesto en el escaso número de resultados positivos que presentan la mayoría de los tratamientos con este fin.

Los resultados obtenidos en un grupo de 27 pacientes sometidos con éxito a un programa de pérdida de peso y que fueron estudiados nuevamente 14 años más tarde, demuestran que solamente 5 de ellos fueron capaces de mantener esa pérdida (89).

Estas observaciones confirman la tendencia a mantener un peso estable en la mayoría de los individuos, y sugieren la necesidad de utilizar otros métodos para lograr una pérdida de peso permanente (Bray, 1976), . . .

J.A. Innes y col. (1974), publicaron en su "Long-term Follow-up of Therapeutic Starvation", (90), los resultados obtenidos en la reducción de peso de 75 pacientes obesos, sometidos a un periodo largo de tratamiento de ayuno. Para ello los clasifica en varios subgrupos basándose en la cuantía del exceso de peso por encima de su "peso ideal", y en él demuestra que los más rebeldes al tratamiento son aquellos que más alejados se encuentran de él. Sugiere que un prolongado ayuno puede obtener un valor permanente si los individuos sometidos a él reducen su peso dentro de un 25 % de su peso ideal, distinguiendo entre el peso inicial, que es aquel peso que tiene el paciente en el momento de iniciar el tratamiento, el peso ideal que es el peso en función de su altura, su sexo y su complexión, y finalmente el peso objetivo, que es el que se debe alcanzar en un tiempo determinado.

El alcanzar el peso objetivo, implica que la reducción de peso se realiza en un tiempo dado, ya que teóricamente siempre se conseguirá este adelgazamiento ante un tratamiento.

Vemos pues que el peso objetivo y el tiempo, son dos parámetros que pueden modificarse fácilmente, de ahí que surjan muchas controversias ante un tratamiento de reducción de peso en función de su eficacia.

Citan distintos autores (91), (92), que un tratamiento es eficaz, cuando la pérdida de peso obtenido en él es persistente, una vez alcanzado el peso objetivo.

Estableciendo una correlación entre edad somática y peso corporal, se pueden diseñar unas tablas que relacionan ambos parámetros y así se puede establecer que el peso medio en el crecimiento final de un adulto es de 50 Kg. aproximadamente.

Complicando más la relación: edad, crecimiento (altura), podemos decir que la altura mínima y media que puede alcanzar un individuo en condiciones fisiológicas normales es de 150 cms., pues bien se puede diseñar una fórmula en la cual están relacionados el peso medio (50 Kg) y la altura en cm. (Fenistein, 1959).

De esta manera se han confeccionado las tablas científicas-documento Geigy, 6ª edición, las cuales relacionan por un lado el peso medio de un individuo y su talla (teniendo en cuenta el sexo). Otras tablas relacionan el peso medio y la superficie corporal.

Se puede comprender que el cálculo para saber el peso

que debe tener un individuo en una edad determinada es de cierta complejidad y ello nos lleva a pensar que el problema que se plantea para definir una obesidad no es sencillo ni tampoco fácil de simplificarlo.

Munro y col., 1970 (93), estudian el problema de la pérdida de peso en sujetos obesos, sometidos a una terapéutica de ayuno bajo el punto de vista de la reducción total que experimentan en el periodo de ayuno.

Nosotros vamos a tratar el problema del exceso de peso desde el punto de vista, como es conocer a través de cada día de ayuno la pérdida de peso experimentada y la influencia que sobre este decrecimiento tiene el peso inicial, para poder describir teóricamente la trayectoria del decrecimiento.

Actualmente se han comenzado a ensayar sustancias como la levadopa (precursora de las catecolaminas), que al impedir que disminuya la actividad simpática en el ayuno, favorece la pérdida de peso de los individuos sometidos a él. Shety, P.S. y col. 1979 (94).

II.- PLANTEAMIENTO GENERAL DE ESTE TRABAJO

PLANTEAMIENTO GENERAL DE ESTE TRABAJO

El presente trabajo está dirigido fundamentalmente ha
cia:

1ª.- Conocer como se realiza la pérdida de peso duran
te la deprivación de calorías que en esencia constituye el
ayuno.

2ª.- Estudiar los cambios metabólicos que ello conlleva
para llegar a la situación fisiológica de adaptación al
ayuno.

3ª.- Estudiar la posible relación existente entre la
pérdida de peso con los cambios metabólicos observados, con
el fin de que podamos obtener mayor información acerca de
cuales son los componentes orgánicos que van a modificarse
en el ayuno.

Trabajando experimentalmente en el laboratorio, noso
tros hemos escogido un grupo de ratas, seleccionando esta es
pecie animal ya que su metabolismo en ciertos aspectos se pa
rece al del hombre; y a éste grupo le hemos dado la denomina
ción de "una muestra de una población animal", la cual nos
va a dar la tendencia del comportamiento general sobre la pér
dida de peso a lo largo de los días.

Con esto tratamos de relacionar la variación del peso
en función del tiempo que puede estar así mismo sujeto a fac
tores que modifican la respuesta al ayuno; como es la varia
bilidad del individuo sometido a éste.

El tiempo en que nosotros hemos hecho la observación

experimental es de siete días y creemos que este planteamiento nos permitirá conocer la trayectoria del proceso de la forma más adecuada para responder a las preguntas planteadas.

Si logramos ajustar los datos observados a una función determinada mediante la cual la sumatoria de los cuadrados de las diferencias con los valores teóricos deducidos por este ajuste sea mínimo, habremos conseguido demostrar que efectivamente la pérdida de peso en un ayuno de siete días responde a una ley numérica, descartando así la arbitrariedad del proceso.

Pero aún así, es éste un problema que no puede enfocarse desde un punto de vista exclusivamente matemático, pues siendo un proceso que transcurre en el ser vivo, son las leyes biológicas las que lo controlan. Por ello, pues, aunque lo tratamos de estudiar matemáticamente ajustando los valores experimentales obtenidos a diferentes funciones matemáticas los resultados que se obtienen en este tratamiento los extrapolamos al ser vivo y pretendemos con ello darnos respuesta a una serie de interrogantes planteados, siempre con las limitaciones propias del hecho de estar estudiando un proceso biológico.

Otra pregunta que nos sugiere este modelo experimental es si la pérdida de peso está condicionada al tiempo de ayuno, es decir, si seguirá produciéndose al aumentar el tiempo, ó bien si por el contrario se tiende a un valor constante de peso por el individuo sometido al ayuno.

La confirmación de una relación numérica entre tiempo de ayuno y pérdida de peso nos llevaría a resolver otras interrogantes que surgen al observar la evolución de peso, como son:

¿Es proporcional la pérdida de peso al peso inicial, esto es al peso que tenía el individuo el día del comienzo del ayuno?, ¿depende la pérdida de peso en cada día de la experimentada el día anterior?.

De otra parte, la adaptación al cambio metabólico que experimentan los individuos sometidos a este proceso, responde a una serie de señales que se pueden valorar mediante el estudio de determinados parámetros sanguíneos siendo una de las primeras consecuencias metabólicas desarrolladas la lipólisis.

Los estados para evaluar la lipólisis son:

Un decrecimiento de la concentración de insulina y un aumento del tono simpático.

Estos dos parámetros de evaluación ¿pueden traducirse en modificadores de las constantes biológicas del suero?.

Para darnos respuesta al proceso de adaptación durante el ayuno hemos programado el trabajo de la siguiente manera:

1ª.- Agrupar en un cuadro general los datos obtenidos de los pesos de las ratas, durante siete días, determinando los valores medios y sus límites de confianza en cada día.

2ª.- Estudio del decrecimiento obtenido mediante una función lineal.

3ª.- Ajustar los valores medios obtenidos por una correlación similogarítmica a una línea de tendencia geométrica.

4ª.- Estudiar el decrecimiento mediante una función hiperbólica.

5ª.- Ajustar la pérdida de peso diario en tanto por cient
to.

6ª.- Clasificación de las ratas en cuatro grupos en fun
ción de su peso en el día 0 (peso inicial).

7ª.- Estudio del comportamiento de los cuatro grupos a
lo largo de los días.

8ª.- Estudio estadístico de las diferencias encontradas
entre los cuatro grupos y con el cuadro general.

9ª.- Determinaciones séricas en las ratas en cada uno de
los días de ayuno.

III.- MATERIAL Y METODOS

III. MATERIAL Y METODOS.

Se separan 50 ratas machos adultas, de raza Wistar, de peso comprendido entre los 250 gramos a 500 gramos; a todas ellas se les deja en las jaulas únicamente con agua para que beban a discreción.

Las jaulas tenían un doble fondo de fácil limpieza que se realiza a diario para que no practicasen la coprofagia.

El momento en que se las apartó la comida, se fija como tiempo 0 del periodo de ayuno. A ése tiempo corresponde la primera pesada. La habitación donde permanecieron durante el ayuno está condicionada a un ciclo de exposición a la luz de 08 h. mañana a 20 h.; de ésa manera no se alteraba su actividad nocturna. Igualmente la temperatura y la humedad permanecieron constantes.

La determinación del peso se realizó en un granatario por el método de la doble pesada y en las horas comprendidas entre las 08 h. a 09 h. diariamente.

Las 50 ratas fueron clasificadas en cuatro grupos atendiendo a su peso en el día 0, de la forma siguiente:

- Grupo 1ª de 250 a 300 gramos.
- Grupo 2ª de 300 a 350 gramos.
- Grupo 3ª de 350 a 400 gramos.
- Grupo 4ª mayores de 400 gramos.

La clasificación de los pesos que hemos realizado, es atendiendo al peso que corresponde al máximo crecimiento corporal en la rata (200-250 g.), al que consideramos como peso ideal,

y a los que le excedan agrupados de forma creciente.

Coincidimos con L.M.Wolf (1974), en su "Patología de la Nutrición", en considerar como "peso ideal", al peso de un individuo joven, adulto, en los cuales las reservas lipídicas están reducidas al mínimo.

Ello permite la comparación del comportamiento observado en ratas de peso normal y en ratas que prodiamos considerar "obesas".

La distribución se realizó sin contar con la edad de los animales, puesto que todas eran ratas adultas y en este apartado lo que más nos interesa es la pérdida de peso corporal en relación con el tiempo.

Así mismo esta distribución de los pesos en cuatro grupos nos permite estudiar si el comportamiento respecto a la pérdida de peso en cada grupo es el mismo.

La pesada diaria tiene como finalidad conocer, en cortos periodos de tiempo la variación de peso, con lo que se puede calcular la tasa de decrecimiento en cada día y compararla con el exceso de peso inicial a fin de conocer su influencia sobre la pérdida de peso.

La variación y comparación de este decrecimiento de peso en el tiempo, se hizo aplicando un tratamiento estadístico a los pesos experimentales según la pauta marcada en el "PlanTEAMIENTO General de este trabajo".

Por otro lado, las determinaciones bioquímicas que se propusieron para valorar los cambios lipídicos durante el transcurso del ayuno, nos han permitido estudiar tales variaciones

en relación a la pérdida de peso en cada día.

Los parámetros bioquímicos séricos estudiados fueron: Glucemia, Colesterinemia, FFA y Lípidos totales; practicándose determinaciones hormonales de Insulina, Glucagón y Hormona de Crecimiento.

III. a. ESTUDIO ESTADISTICO DEL DECRECIMIENTO DE PESO

Resumiendo en un cuadro general la evolución de la pérdida de peso a lo largo del ayuno, se han agrupado las 50 ratas con los pesos obtenidos en los siete días (Tabla nº 1).

Con esta tabulación ó forma de presentar los datos obtenidos en nuestro trabajo experimental, pretendemos hacer el tratamiento estadístico de manera que se pueda llegar a conocer si existe una asociación entre la variables tiempo-peso, que nosotros hemos utilizado.

Para ello se calcula en cada día de ayuno la media aritmética, como valor de tendencia central, su desviación estándar y coeficiente de variación.

En nuestro trabajo nos interesa llegar a conocer en qué medida el tiempo influye en la pérdida de peso, para lo cual debemos hallar la mejor correlación entre las dos variables e intentar saber si es ó no la tendencia diagonal la que mejor la define.

De aquí que nuestras dos variable tiempo y peso, las tenemos relacionado mediante tres funciones.

- lineal
- exponencial
- hiperbólica

En primer lugar hemos definido un función lineal de la forma;

$$P_t = at + b \quad (1)$$

en la que " P_t ") es el peso medio de la población animal en el tiempo " t " de ayuno y " a " y " b " los coeficientes de regresión poblacionales.

El paso previo al ajuste según una línea recta es establecer el diagrama de dispersión entre los dos puntos obtenidos en la observación experimental.

Para llevar a cabo el ajuste ha sido necesario calcular " a " y " b ", los coeficientes de regresión de la muestra por el método de los mínimos cuadrados, siendo sus valores así hallados los que harán mínima la suma de las desviaciones al cuadrado. Entre cada observación " Y ", y la media de las observaciones " \bar{Y} ".

En segundo lugar hemos estudiado el decrecimiento de peso mediante una función exponencial de la forma:

$$f(y) = b \cdot a^{-kt} \quad (2)$$

utilizamos el exponente de e con el signo negativo ya que al aumentar el tiempo de ayuno t , la función es decreciente.

Llamando $f(y)$ al peso de cada rata en el tiempo t , podemos escribir (2) de la forma:

$$P_t = b \cdot e^{-kt}$$

siendo b y k dos constantes.

Y por último hemos realizado un ajuste de los pesos experimentales en el tiempo mediante la ecuación de una hipérbola de la forma:

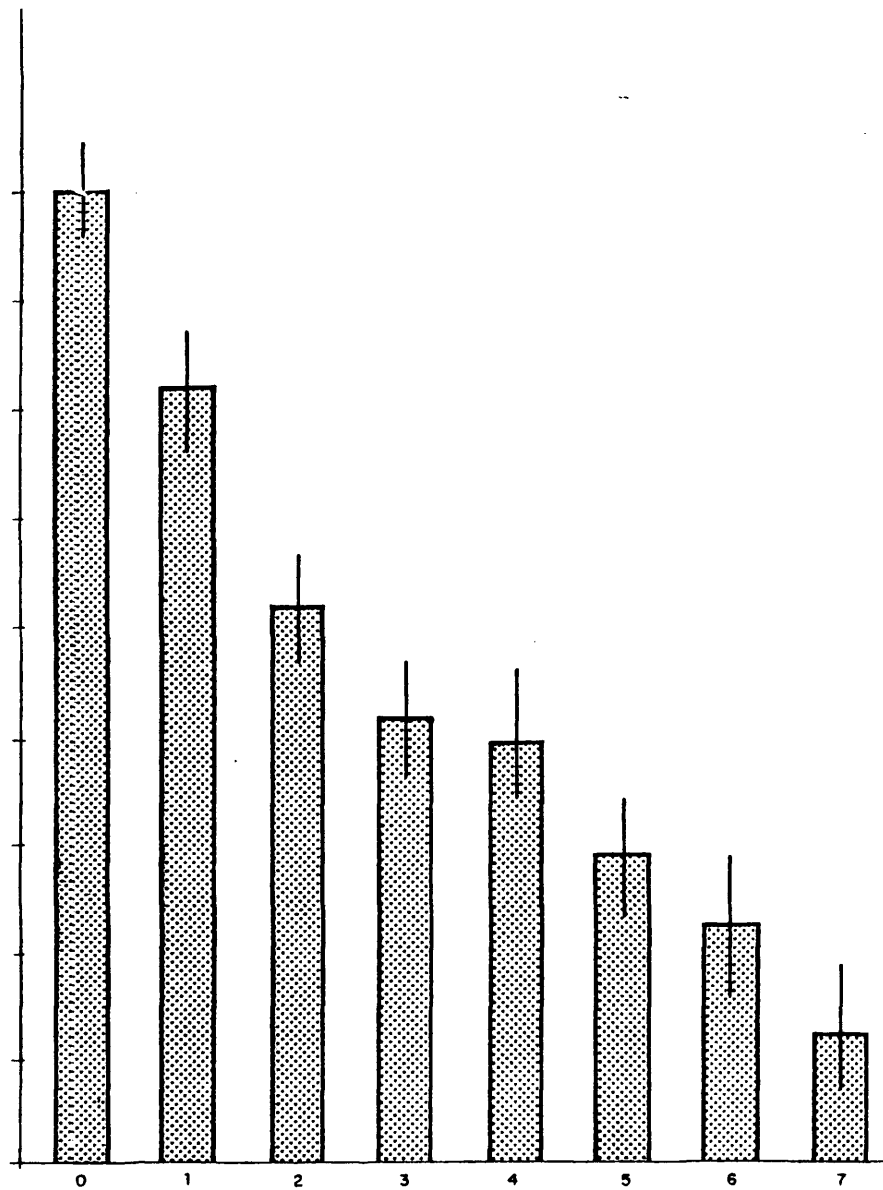
$$(p - a)(t - b) = K \quad (3)$$

siendo b y k constantes y a la asíntota de la hipérbola.

	0	1	2	3	4	5	6	7
1	265,6	240,7	228,7	215,5				181,96
2	262,1	245,0	232,3	219,0	207,9	198,2	197,4	188,1
3	279,2	257,0	244,5	231,0	219,9	208,7	207,9	194,8
4	279,4	257,92	244,65	236,8				194,4
5	284,3		263,2					
6	291,0		269,0	255,15	247,7	237,0	226,4	213,8
7	291,2		268,4	257,9	249,5	239,1	230,0	221,1
8	299,0		261,5		232,0		213,7	
9	299,6	287,9	275,0	259,1	245,9	235,0	233,1	223,3
10	311,0					245,5		
11	302,6		273,78					
12	306,4	290,0	277,1	265,0		251,90		
13	310,0		285,2					
14	309,2	297,2	282,0	274,0		262,30		
15	310,8		285,2	274,7	271,9	269,40	257,61	251,4
16	311,0	295,4	281,0	271,30		253,40		
17	318,7	304,0	285,6	274,3	266,1	254,8	248,2	239,4
18	323,6		296,0					
19	325,1	306,0	288,0	268,6	263,2	257,7	252,5	245,1
20	330,6		310,2					
21	340,5	321,45	302,9	288,2	279,5	272,1	267,3	260,7
22	341,4	322,85	306,15	294,0	269,61			
23	344,9	328,4	310,9	294,8	282,7	270,6	273,7	265,1
24	349,0	331,2	310,7	296,5	286,4	274,8	273,2	266,3
25	359,5	336,4		311,0				
26	362,0			329,0		310,0		
27	364,2	340,8	321,4	309,7	305,9	301,8	292,2	276,5
28	365,5	344,4	326,1	310,2	309,4	304,1	293,6	279,7
29	369,5			306,0		285,0		266,0
30	372,2	352,0	337,4	321,3	316,9	308,7	303,9	293,0
31	373,5	350,8		326,35				
32	375,5		338,7	323,5				
33	378,0	355,9	332,3	326,2	319,7	314,2	306,9	291,8
34	380,1	346,15	337,7					
35	382,1	347,0	334,7					
36	386,0			312,0		291,0		271,5
37	389,2	367,2	351,0	331,7	329,0	320,4	315,3	299,7
38	392,5	366,8	343,2					
39	398,8	378,7		343,1				
40	411,0		387,1					
41	431,0		368,5			343,0		330,0
42	434,0				366,0			339,0
43	434,0		389,0			351,0		331,0
44	456,0	425,8	417,0	400,0	387,0	384,4	374,9	374,9
45	449,8	423,0	405,7	386,5	379,7	378,7	370,7	367,7
46	453,8	412,7	405,8	379,1	367,5	356,4	346,6	345,3
47	463,5		424,6		410,2	394,1		
48	468,2	444,0	427,3	406,1	395,0	388,0	378,1	376,7
49	493,0	466,0	457,1	438,3	420,8	420,7	406,5	407,2
50	513,0	489,0	469,0	449,9	438,5	432,85	424,0	421,1
n	50	31	42	36	26	31	23	29
\bar{X}	360,64	342,64	322,75	311,00	309,30	297,48	291,35	283,36
DS	63,08	62,24	61,68	59,55	64,94	60,16	66,00	66,14
ES	8,92	11,18	9,52	9,93	12,74	10,80	13,76	12,36

TABLA N° 1 - PESOS EXPERIMENTALES DE LAS 50 RATAS UTILIZADAS EN NUESTRO TRABAJO, SE DETALLAN LOS PESOS OBTENIDOS EN CADA DIA DE AYUNO, INCLUYENDO EL PESO INICIAL (DIA 0).

HISTOGRAMA DE LOS PESOS
 $\bar{x} - DS$



GRAFICA Nº 1 - HISTOGRAMA QUE NOS REPRESENTA LOS PESOS EXPERIMENTALES DE LAS
50 RATAS EN LOS 7 DIAS DE AYUNO.
LAS BARRAS NOS INDICAN LAS DESVIACIONES STANDARD EN CADA DIA

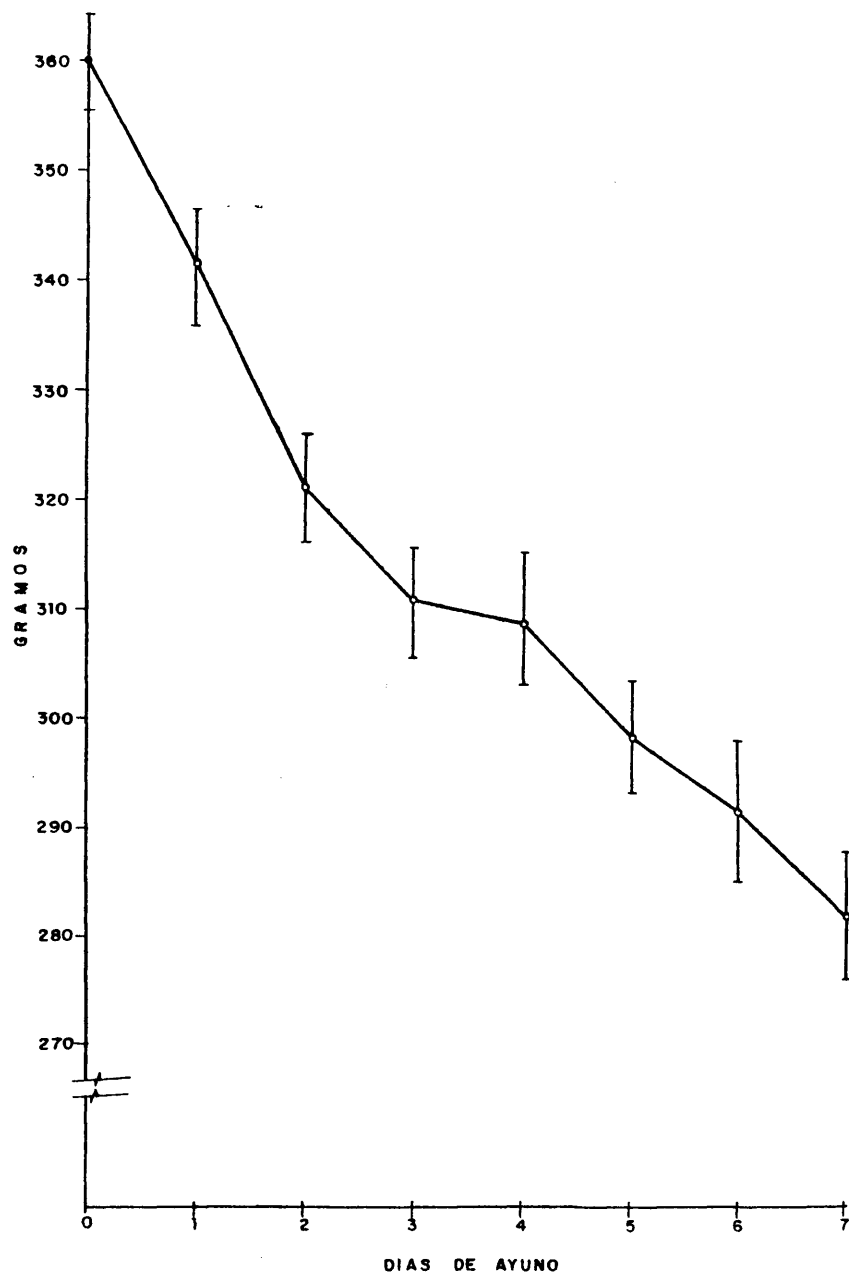


FIG. 2 - PESOS REALES OBTENIDOS DE LAS 50 RATAS EN LOS 7 DIAS DE AYUNO, INCLUYENDO TAMBIEN EL DIA 0 COMO PESO INICIAL DEL EXPERIMENTO; LOS PUNTOS REPRESENTAN LOS PESOS MEDIOS EN CADA DIA.

III. a. 1.- Correlación lineal entre tiempo y pesos reales.

En primer lugar se intentan ajustar los datos experimentales mediante una correlación de tipo lineal. Para ello con los datos de la tabla n° I y haciendo que la variable X tome los valores del tiempo de ayuno (días 0 a 7), expresados en días e Y tome los valores de la media aritmética de los pesos expresados en gramos, se calcula el coeficiente de correlación r , y la ecuación de la recta de la forma $y = ax + b$, siendo a la pendiente de la recta y b la ordenada en el origen (peso en el día); nosotros hemos ajustado nuestros datos por el método de los mínimos cuadrados así obtenemos los siguientes valores.

CUADRO N° I

tiempos	pesos reales	pesos teóricos	(diferencia) ²
0	360,64	351,27	87,7969
1	342,64	340,85	3,2041
2	322,75	330,44	59,1361
3	311,00	320,02	81,3604
4	309,30	309,61	0,0961
5	297,48	299,19	2,9241
6	291,35	288,78	6,6049
7	283,36	278,36	25,0000
			$\Sigma x = 266,1226$

el coeficiente de correlación así obtenido r toma el valor de:

$$r = -0,9720132$$

y la ecuación de la recta queda de forma:

$$P_t = 352,27 - 10,41571 t \quad (4.)$$

siendo P_t el peso en gramos para el día t de ayuno.

Como el coeficiente de correlación r ha tomado un valor negativo, nos confirma que la variable peso, tiende a disminuir a medida que el tiempo crece.

Asimismo como el valor de r es muy próxima a la unidad, significa que entre las dos variables hay una estrecha relación.

Al ajustar los valores de los pesos reales en la recta obtenida por esta correlación se obtienen los pesos teóricos ya detallados. (cuadro nº 1)

Las diferencias entre los pesos reales y los pesos teóricos por este ajuste de tendencia lineal son los siguientes:

CUADRO N°2.

tiempo	diferencias
0	9,37
1	1,70
2	-7,69
3	-9,02
4	-0,31
5	-1,71
6	2,57
7	5,00
	<hr/>
	$\Sigma = 0,00$

- 75 -

que nos expresa que las mayores diferencias obtenidas son en los días 0, 2 y 3 (9,37, -9,02 y -7,69 respectivamente).

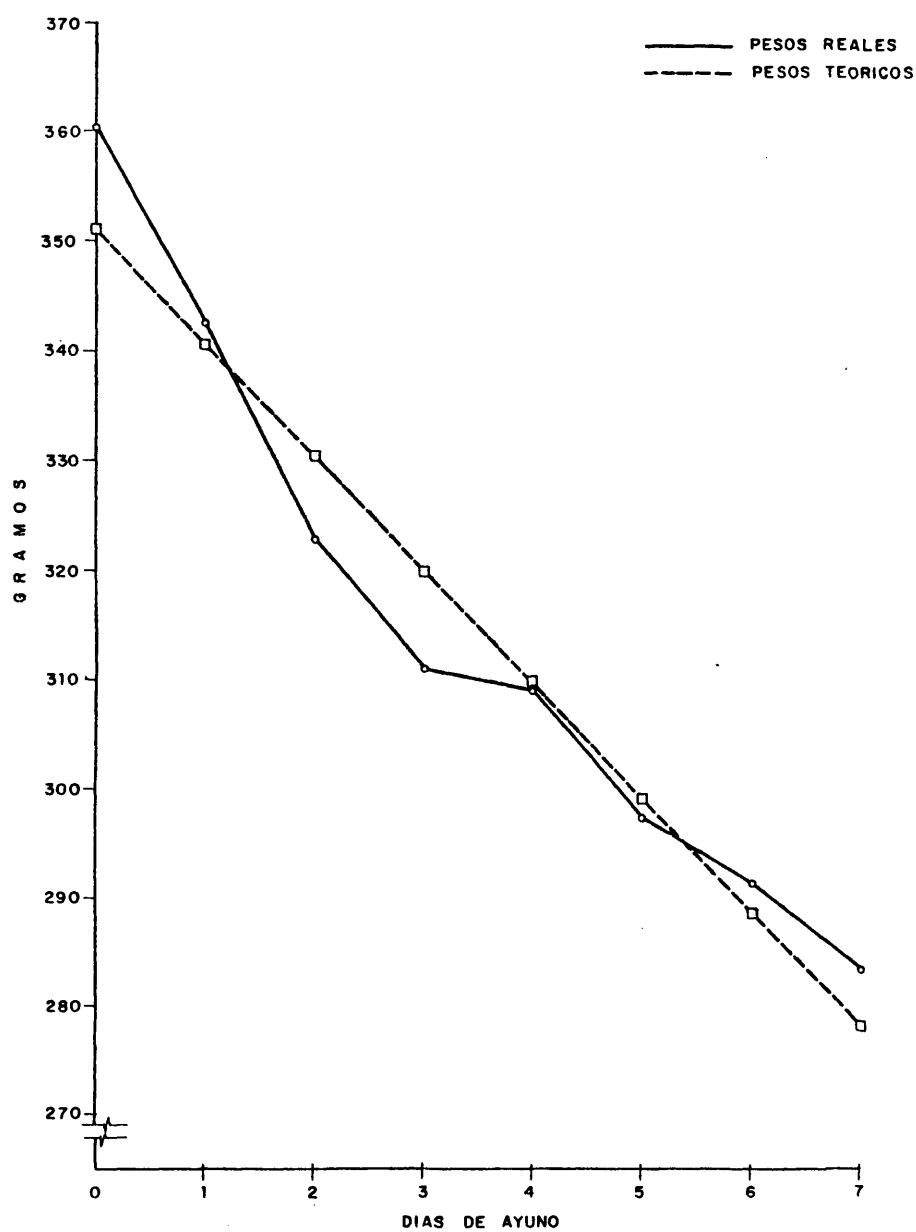


FIG. 3- PESOS EXPERIMENTALES Y AJUSTE LINEAL EN LOS 7 DIAS, INCLUYENDO EL PESO INICIAL (DIA 0).

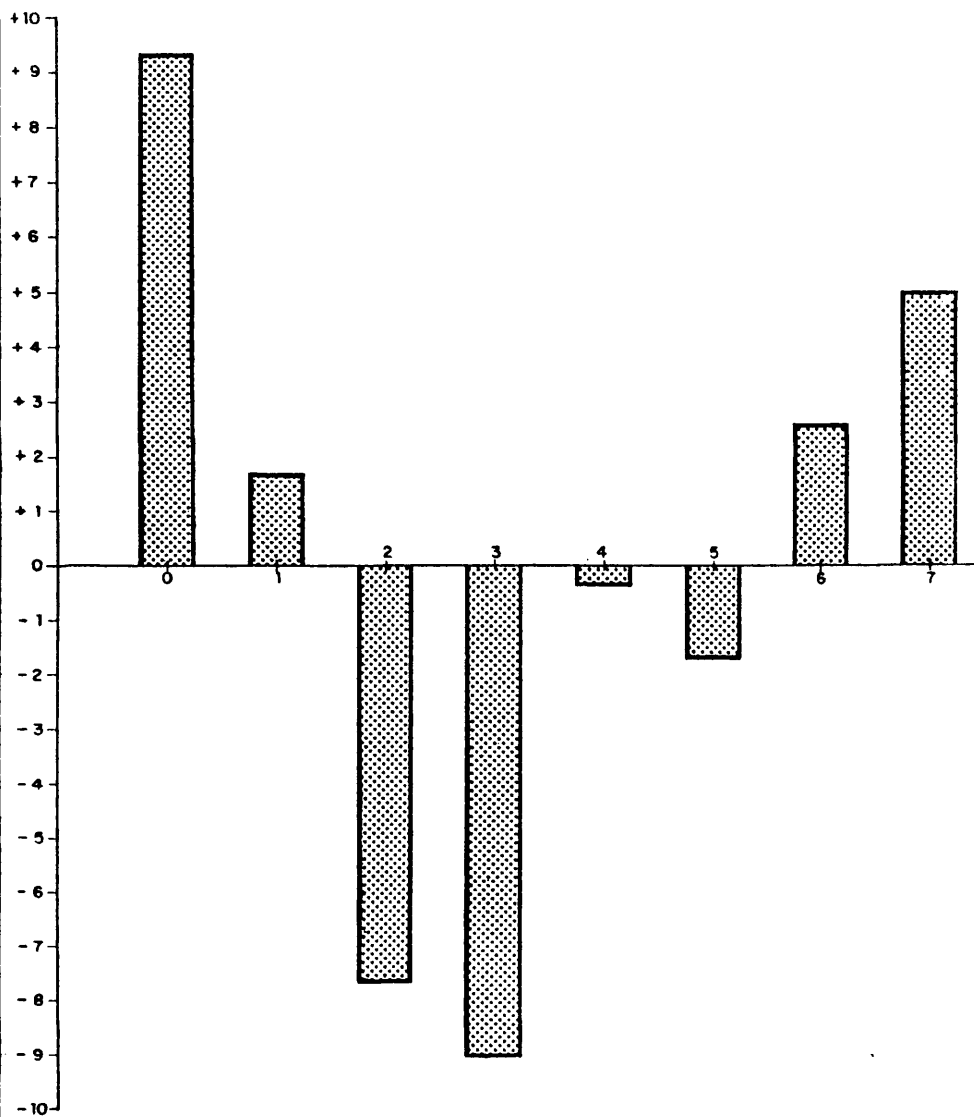


FIG. 4 - DIFERENCIAS OBTENIDAS CON EL AJUSTE LINEAL DE LOS PESOS EXPERIMENTALES.

III. a. 2. Correlación entre tiempo y logarimos decimales de los pesos.

Intentando hacer una correlación que define mejor esta dependencia; a la variable y (peso medio en cada día), le hemos hallado sus logaritmos decimales para efectuar una correlación lineal entre tiempo t y logaritmos decimales de los pesos.

A tal fin en el cuadro n° 3 se disponen en columna los valores de los tiempos, las medias de los pesos reales en cada día, los logaritmos de las medias de los pesos reales, los logaritmos teóricos encontrados según esta correlación, sus correspondientes cologaritos y por último las diferencias de los pasos teóricos de las medias elevadas al cuadrado.

Como obtenemos un valor de $\sum (\bar{x} - \bar{x}_i)^2$ menor que el hallado anteriormente, comprobamos que efectivamente se ha logrado un mejor ajuste al tomar los logaritmos de los pesos reales.

El valor del coeficiente de correlación r en éste ajuste de tendencia geométrica, fué de

$$r = -0,9789164$$

siendo la ecuación de la recta:

$$\log. P_t = 2,546511 - 0,01421267 t \quad (5)$$

Calculadas las desviaciones respecto de las medias en cada día, observamos que éstas se hacen mayores para los tiempos 0, 2 y 3 (8,67, -6,92 y -8,06 respectivamente).

C U A D R O N° 3

tiempo	pesos reales	log. pesos	log. teóricos	pesos teóricos	(desviación) ²
0	360,64	2,557074	2,546511	351,97	75,1689
1	342,64	2,534838	2,532298	340,64	4,0000
2	322,75	2,508866	2,518086	329,67	47,8864
3	311,00	2,492760	2,503873	319,06	64,9636
4	309,30	2,490380	2,489661	308,79	0,2601
5	297,48	2,473458	2,475448	298,85	1,8769
6	291,35	2,464415	2,461235	289,23	4,4944
7	283,36	2,452380	2,447023	279,91	11,9025
					$\Sigma = 210,5528$

Ajuste obtenido mediante la correlación semilogarítmica deducida por la ecuación (2).

CUADRO N° 4.

tiempo	diferencia
0	8,67
1	1,992
2	-6,920
3	-8,060
4	0,510
5	-1,370
6	2,120
7	+3,45

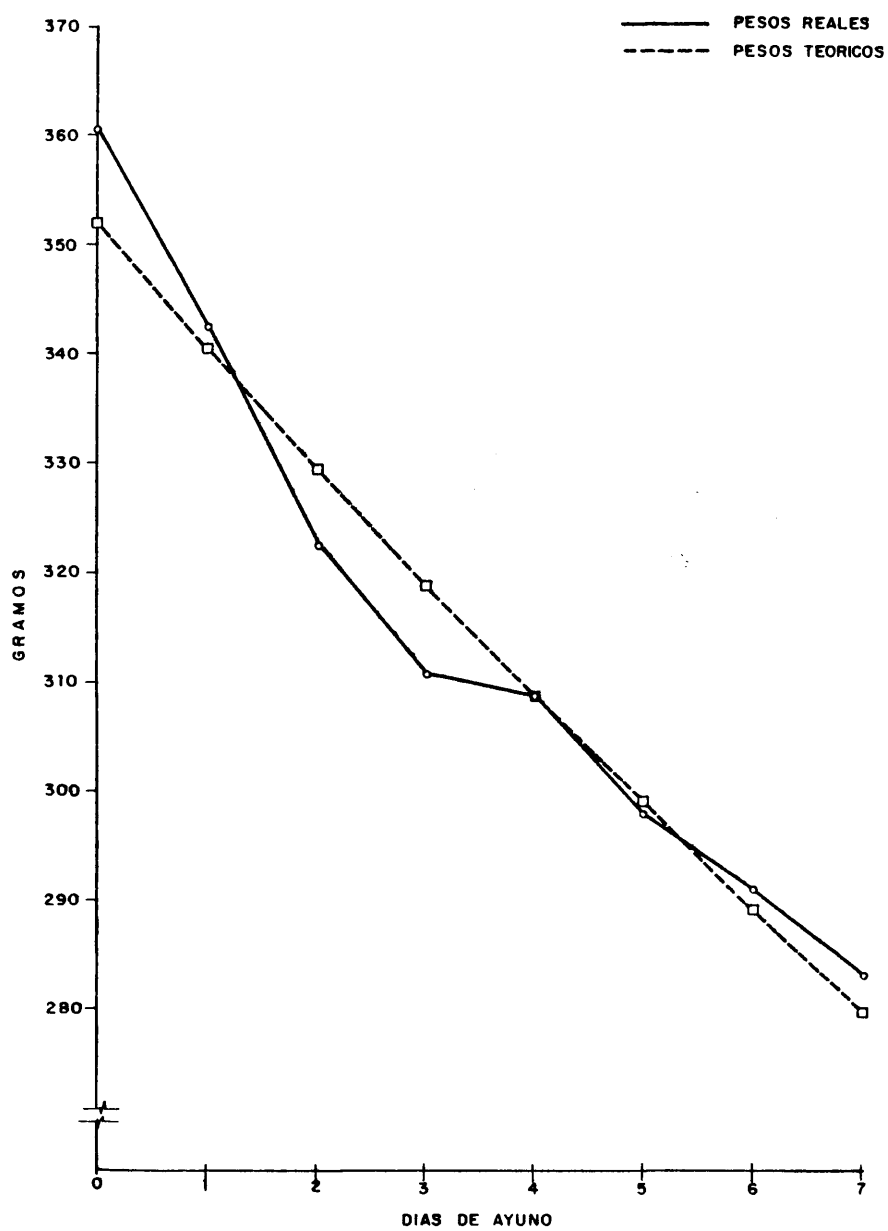


FIG. 5 - PESOS EXPERIMENTALES, EN UN AJUSTE SEMILOGARITMICO, LOS PUNTOS SON LOS VALORES MEDIOS

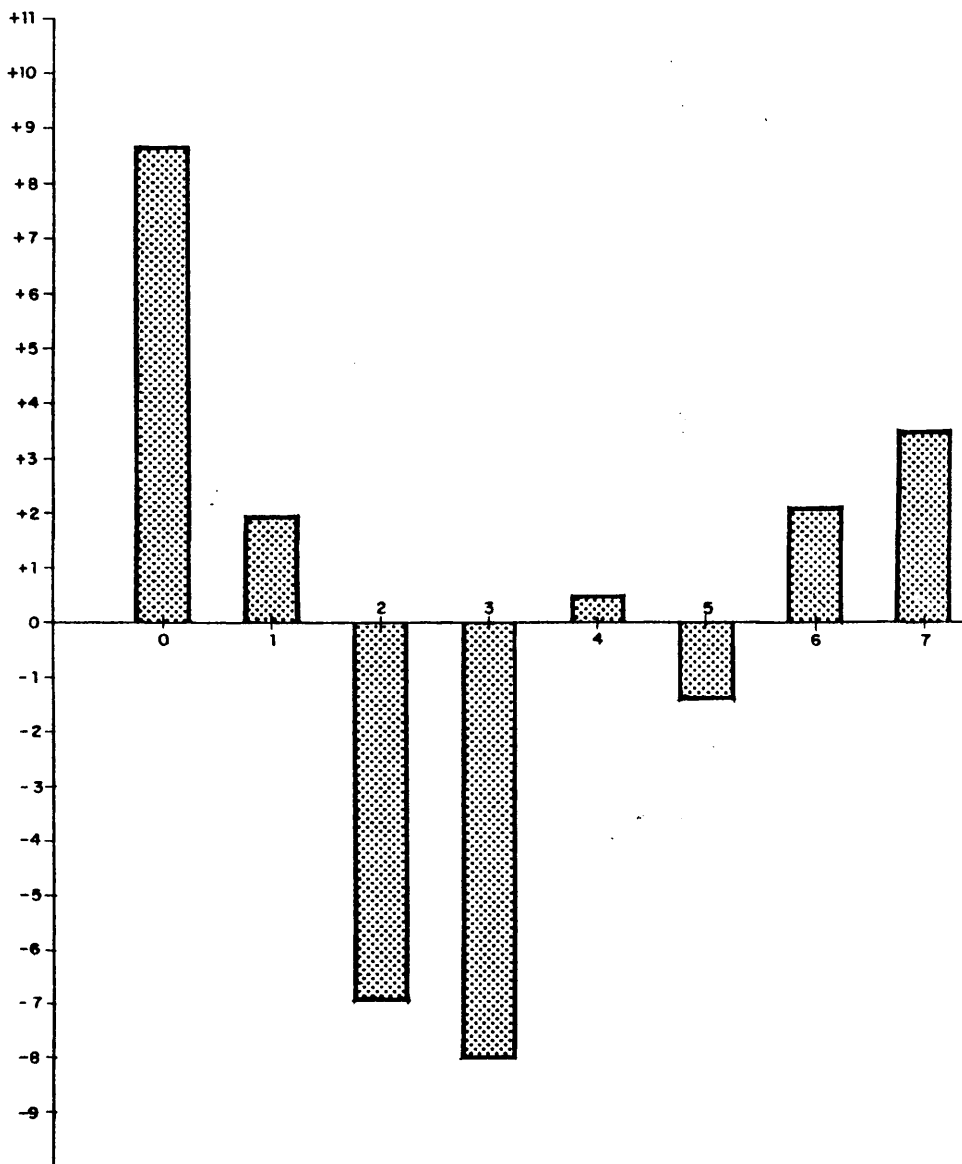


FIG. N° 6 - DIFERENCIA EN EL AJUSTE SEMILOGARITMICO

III.a.3 .- Función exponencial.

Las consideraciones anteriores demuestran que la sensible mejora que se obtiene al ajustar los datos por la correlación entre tiempo y logaritmos de los pesos reales, sea la pauta para elegirla como la que nos proporciona el mejor método de ajuste para nuestros datos experimentales.

Pero a todos estos razonamientos tenemos necesidad de hacer la siguiente objeción: y es que aún cuando los datos que hemos obtenido al intentar hallar la correlación entre nuestras dos variables peso-tiempo, nos han permitido llegar a obtener un buen coeficiente de correlación, nos encontramos con la gran dificultad de que al aumentar el tiempo de ayuno el peso irá decreciendo hasta llegar a hacerse 0.

Esto es, teóricamente la pendiente "a" nos da la tasa de decrecimiento constante en cada tiempo, de tal manera que para $t \rightarrow \infty$ la tendencia de la línea recta es tal que llegaría a cortar al eje de abscisas.

Todo lo que acabamos de exponer, aún siendo el proceso teórico definido por la ecuación de la línea recta hallada, no es válido para conocer el comportamiento de la pérdida de peso en el ayuno, ya que el peso del ser vivo no se hace cero aún cuando el tiempo de ayuno se prolongue suficientemente.

Ello hace que probemos otras funciones que definan con mayor propiedad el comportamiento de un ser vivo en el ayuno, en cuanto a pérdida de peso se refiere.

Una función que se ajusta mejor a la trayectoria de la pérdida de peso en el tiempo de ayuno, es la función exponencial de la forma:

$$f(y) = b.e^{-kt} \quad (6)$$

Utilizamos el exponente de e con signo negativo ya que al aumentar el tiempo de ayuno t, la función anterior es de creciente.

Llamando $f(y)$ al peso de cada rata en el tiempo t, podemos escribir la expresión (6) de la forma:

$$P_t = b.e^{-kt} \quad (7)$$

siendo b y k dos constantes.

Como toda función semilogarítmica de la forma (5), puede expresarse en forma exponencial con base el n^a e, podemos pues transformar la ecuación (2) en una exponencial de la forma:

$$P_t = 351.9741.e^{-0,032726 t} \quad (8)$$

sin más que hallar el antilogaritmo de 2.546511 y dividir el coeficiente de regresión a (0,0142127), por el logaritmo decimal del número e.

Si con la función (8) efectuamos una correlación entre tiempos y pesos obtendríamos como obviamente se puede observar, los mismo resultados que con la ecuación (5), que ya he

mos razonado arriba es una buena correlación; esto unido a que la representación geométrica de la función exponencial está más de acuerdo con la experiencia fisiológica que hemos realizado, nos permite expresar que la pérdida de peso en un ayuno de siete días, puede definirse mediante una función exponencial de la forma (6). (gráfica nº 5)

III.a.4. . Hipérbola.

No obstante, a pesar de los buenos resultados obtenidos en la estimación de la trayectoria del proceso por los métodos ya expuestos, no se puede inferir estadísticamente que se ajuste al comportamiento biológico, ya que al igual que hemos razonado anteriormente (III.a.3) para la tendencia lineal, en la función exponencial ocurre que para $t \rightarrow \infty$, $f(y) \rightarrow 0$.

De aquí que hallamos probado otra función: la hipérbola, que estimamos define mejor la tendencia de la pérdida de peso a lo largo del ayuno.

La ecuación de la hipérbola que vamos a utilizar en nuestro estudio, es la de una curva que corta el eje de ordenadas en P_0 (peso medio de las ratas en el día del comienzo del ayuno) y tiene un asíntota a de signo positivo cuyo significado es el del peso conservado al que tiende asintóticamente la curva cuando la variable tiempo tiende a infinito.

Ya el profesor J.Tamarit Torres, publicó en el año 1955 (95), la aplicación de la ecuación general de una hipérbola a un proceso fisiológico "Una nueva ley de evacuación gástrica", estudiando en este trabajo experimental la evacuación gástrica como proceso dependiente del tiempo.

Podemos pues escribir la ecuación general de la hipérbola de la forma:

$$(P-a) (t+b) = K \quad (9)$$

siendo b y K constantes y a la asíntota de la hipérbola.

Como para $P=P_0$ la ecuación anterior queda de la forma:

$$(P_0 - a)b = K \quad (10)$$

entre (9) y (10), podemos escribir:

$$\frac{P_0 - a}{P_0 - P} = 1 + b \frac{1}{t} \quad (11)$$

dividiendo ambos miembros de (11) por $P_0 - a$, nos queda de la forma:

$$\frac{1}{P_0 - P} = \frac{1}{P_0 - a} + \frac{b}{P_0 - a} \frac{1}{t} \quad (12)$$

expresada de esta forma la ecuación de la hipérbola (9), nos permite establecer una correlación lineal entre $\frac{1}{P_0 - P}$ y los valores inversos de los tiempos $\frac{1}{t}$.

Los valores hallados en esta estimación, utilizando los valores de los pesos medios en cada día de ayuno, para el coeficiente de correlación r el coeficiente de regresión a y la ordenada en el origen b son los siguientes:

$$r = 0.99205452$$

$$a = 0.04846377$$

$$b = 0.005588$$

Comprobamos de esta manera la estrecha correlación existente entre los valores inversos de las diferencias de peso ($\frac{1}{P_0 - P}$), en cada día, y los valores inversos de los tiempos $\frac{1}{t}$, así como nos permite calcular el valor de la asíntota a , la constante b así como el valor de K en (10).

$$a = 181.68$$

$$b = 8.67$$

$$K = 1.551,94112$$

Así la ecuación general de la hipérbola (9) queda con los datos de nuestro trabajo experimental de la forma:

$$(P-181.68)(t+8.672) = 1.551,94112 \quad (13)$$

Que nos permite describir el proceso para cada rata de las 50 semetidas al ayuno y para las medias aritméticas de los pesos de cada día P.

La gráfica obtenida se representa disponiendo en abscisas los tiempos y en ordenadas los pesos medios de las cincuenta ratas (gráfica nº 7), según este ajuste.

Los valores hallados para los pesos reales según la correlación que acabamos de exponer son los siguientes:

CUADRO N° 5

tiempos	pesos reales	pesos teóricos
0	360,64	360,64
1	342,64	342,13
2	322,75	327,10
3	311,00	314,64
4	309,30	304,15
5	297,48	295,19
6	291,35	287,45
7	283,36	280,70

En el cuadro n° 6 se representan las desviaciones de las medias de los pesos reales encontrados de los pesos teóricos así como la sumatoria de tales diferencias elevadas al cuadrado:

CUADRO N° 6

tiempos	$\bar{X}_1 - \bar{X}_r$	$(\bar{X}_1 - \bar{X}_r)^2$
0	0,12	0,0144
1	0,51	0,2601
2	- 4,35	18,9225
3	- 3,64	13,2496
4	5,15	26,5225
5	2,29	5,2441
6	3,90	15,2100
7	2,66	7,0756
		<hr/>
		Σ 86,4988

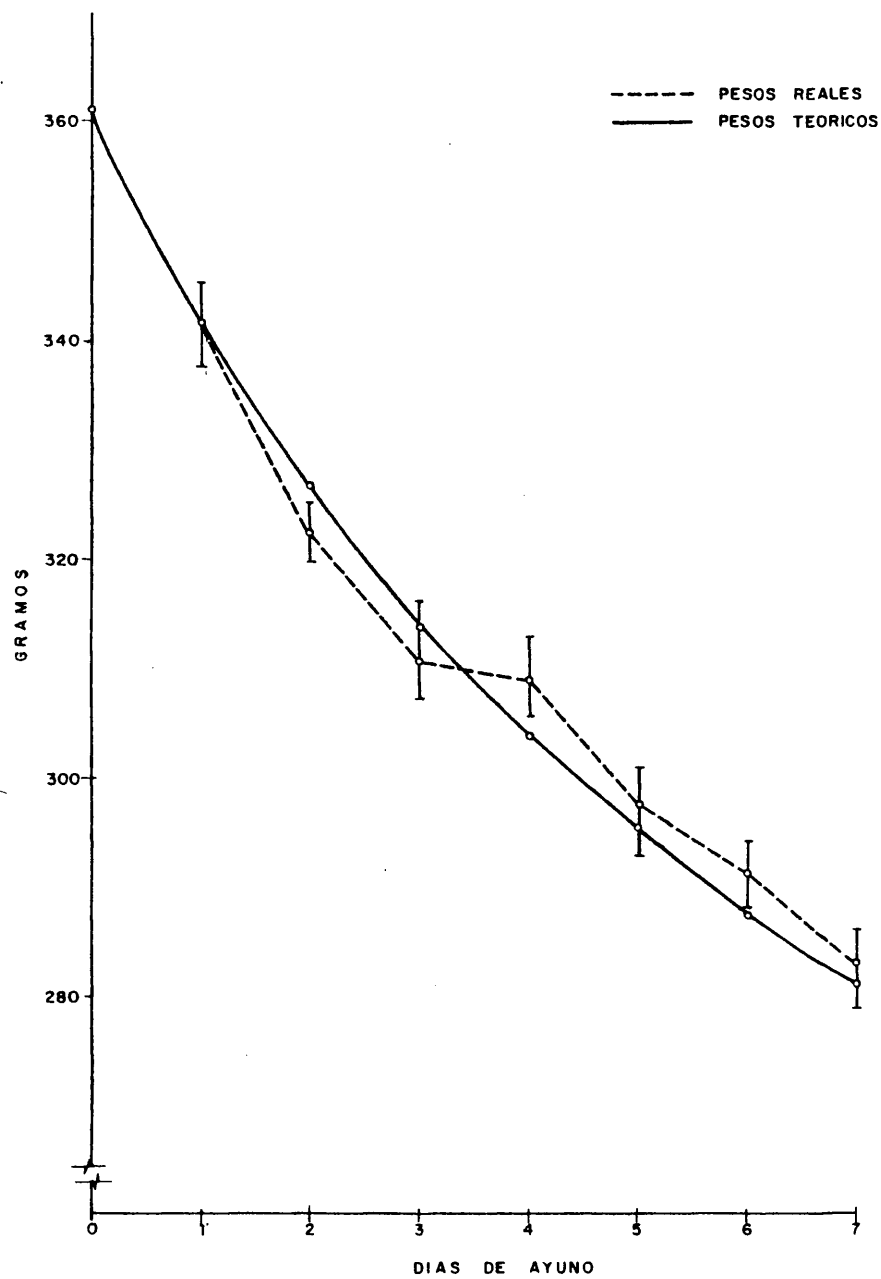


FIG. 7 - EVOLUCION DE LA PERDIDA DE PESO MEDIANTE UN AJUSTE HIPERBOLICO, SE COMPARA CON LOS VALORES MEDIOS DE LOS PESOS REALES DE LOS SIETE DIAS DE AYUNO.

III. b.- Selección del método estadístico que mejor define el proceso.

Resumiremos en un cuadro (cuadro nº 7.), a fin de hacer una comparación más gráfica, los valores hallados en las distintas correlaciones efectuadas, del coeficiente de correlación, coeficiente de regresión y ordenada en el origen de cada una de ellas.

Lo que nos pone de manifiesto, que el coeficiente de correlación "r", aumenta sensiblemente cuando se considera la función hiperbólica, así como por este método disminuyen las diferencias existentes entre la ordenada en el origen y el dato experimental en el tiempo 0 (día del comienzo del ayuno).

Para el método semilogarítmico la pendiente "a", y la ordenada en el origen "b", se han comparado obteniendo previamente sus antilogaritmos.

Así mismo estudiamos y comparamos con cual de los métodos propuestos se hace mínima la sumatoria de las desviaciones al cuadrado, como propiedad de un buen ajuste, cuadro sig., y podemos igualmente observar que el valor mínimo se obtiene en la última correlación realizada (entre los valores inversos de F_0-P y los valores inversos de los días de ayuno).

	$(\bar{X}_r - \bar{X}_i)^2$
1 ^{er} método	266,1226
2 ^a método	210,5528
3 ^{er} método	86,4988

Observamos que la correlación efectuada mediante la función hiperbólica es la que hace mínima la sumatoria de las

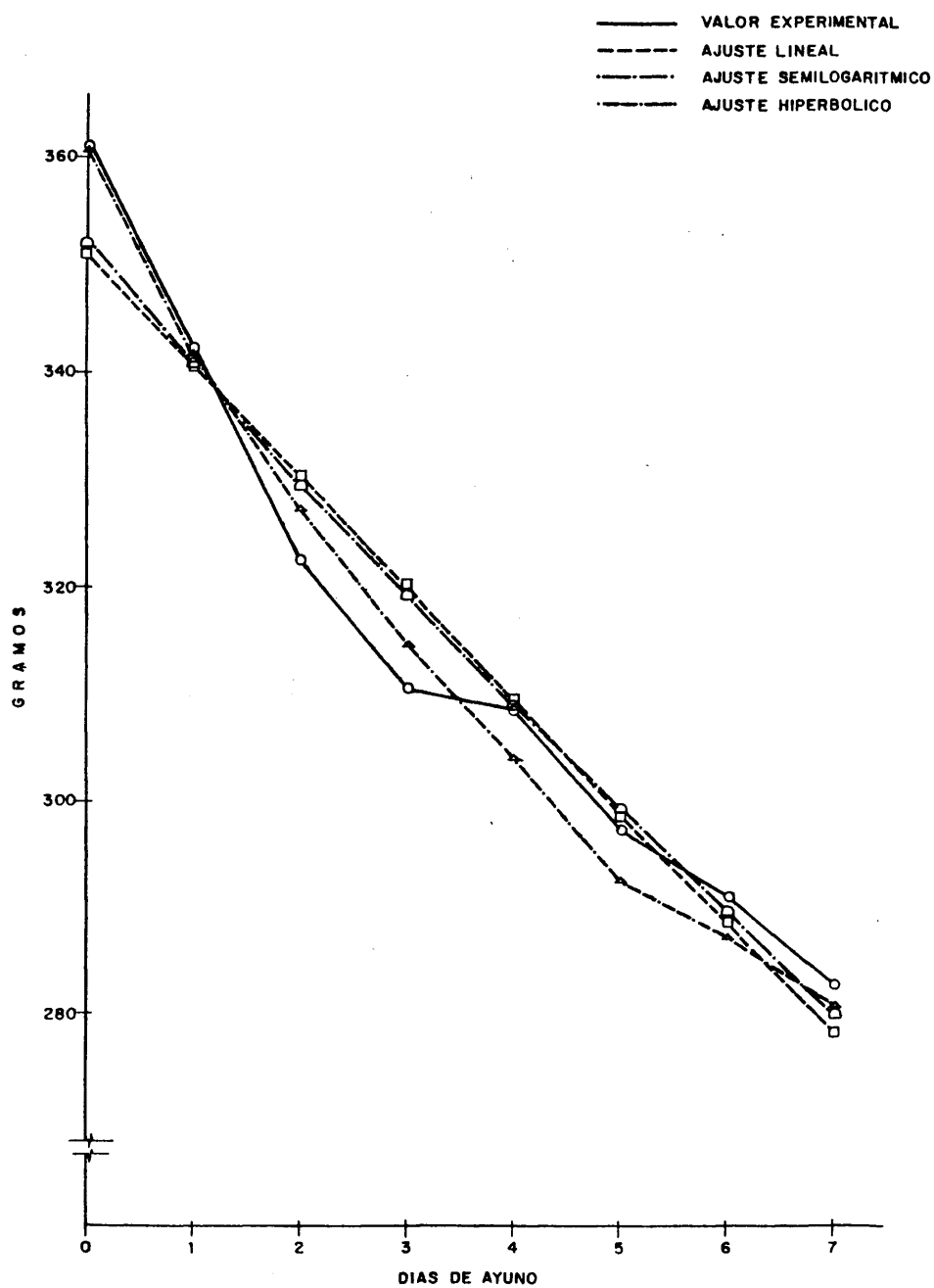


FIG. N° 8 - AJUSTE LINEAL, EXPONENCIAL E HIPERBOLICO, EN COMPARACION A LOS PESOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS A LO LARGO DE LOS 7 DIAS DE AYUNO.

desviaciones al cuadrado de los valores experimentales hallados, esto unido a que su trayectoria es la que mejor define el comportamiento de la evolución de la pérdida de peso en el ayuno ha hecho que la seleccionemos entre todas las estudiadas para definir el comportamiento del proceso.

Nosotros podemos pues para cada observación trazar una hipérbola que se ajuste a ella, pero lo que hemos representado en la gráfica n° 8 es el proceso total de las observaciones realizadas con los 50 animales de experimentación, tomando como punto de representación los valores medios del peso real hallado para el total de los siete días de ayuno.

El siguiente cuadro nos permite comparar detalladamente los tres métodos estadísticos propuestos, y la figura n° da a conocer la trayectoria del proceso estableciendo una comparación gráfica entre ellos.

CUADRO N° 7

	1 ^{er} mét.	2 ^a mét.	3 ^{er} mét.
r	-0.9720132	-0.9789164	0.99205452
a	-10.41571	-1.3871	0.04846377
b	351.27	351.57	360.52

III.C. Otra forma de expresar la pérdida de peso - Pesos relativos.

Analizando en el cuadro general los parámetros estadísticos: media aritmética y su desviación estandar, nos encontramos con una gran dispersión de los valores individuales respecto a la media; lo que nos lleva como consecuencia a introducir otra forma de expresar la evolución de la pérdida de peso, para lo que establecemos entre T_t y P_0 la relación siguiente:

$$P_r = \frac{P_t \times 100}{P_0} \quad (14)$$

llamando P_r al peso relativo de cada rata en el tiempo t .

P_t al peso de cada rata en el tiempo t , y

P_0 al peso de cada rata en el tiempo 0.

y de la igualdad (3) se obtiene el peso en cada día expresado en tanto por ciento de peso conservado, a fin de conseguir que la pérdida de peso, sea decreciente a lo largo del tiempo. (Cuadro general, en tanto por ciento) (tabla n° 2)

Estudiados mediante esta transformación los parámetros estadísticos arriba mencionados, se observa como se ha conseguido salvar la gran dispersión que se acusó en el cuadro general al utilizar como valores de la variable independiente los pesos reales de las 50 ratas.

Los pesos relativos deducidos de aplicar (14) a cada uno de los pesos experimentales nos permite conseguir una mayor homogeneidad en nuestros resultados que nos va a ser de gran utilidad en los capítulos siguientes en los que pretendemos establecer comparaciones entre los distintos días de ayuno.

	0	1	2	3	4	5	6	7
1		94,17	89,48	84,31				71,19
2		93,83	88,97	83,88	79,63	75,91	75,53	72,04
3		92,05	87,57	82,74	78,76	74,75	74,46	69,77
4		92,31	87,56	84,75				
5			92,57					
6			92,44	87,68	85,12	81,44	77,80	73,47
7			92,17	88,56	85,68	82,11	78,98	75,93
8			87,46		77,59		71,47	
9		96,09	91,79	86,48	82,08	78,44	77,80	74,53
10						78,93		
11		94,98	90,35	87,23		81,48		
12			92,00					
13		96,11	91,20	88,62		84,35		
14			90,48					
15		94,84	89,94	86,37	79,20			
16			91,47					
17		94,65	90,44	86,49		82,21		
18			93,83					
19			91,76	88,38	87,48	86,68	82,89	80,89
20		94,90	89,03	84,96	81,78	78,74	78,28	76,30
21		95,47	90,38	85,70	82,18	79,56	78,66	77,06
22		94,41	88,96	84,64	82,09	79,91	78,50	76,56
23		95,39	89,61	86,07	83,50	79,95	77,88	75,12
24		94,12	88,59	82,62	80,96	79,27	77,67	75,39
25				80,83		75,39		70,34
26		91,07	88,85					
27				82,81		77,13		71,99
28		90,80	87,60					
29				90,88		85,64		
30		93,57		86,51				
31		94,15	87,91	86,30		82,12	81,19	
32		93,92		87,38	85,60			
33		94,96			86,03			
34		90,90	87,44					
35			92,83	86,15				
36		94,57	90,65	86,32	85,14	82,94	81,67	78,72
37		94,37	90,18	85,23	84,53	82,32	81,01	77,00
38		94,23	89,22	84,87	84,65	83,20	80,33	76,53
39		93,57	88,25	85,04	83,99	82,87	80,23	75,92
40			85,50			79,58		76,57
41					84,33			78,11
42			89,63			80,88		76,27
43		93,38	91,45	87,72	84,89	84,30	82,21	82,21
44		90,94	89,42	83,54	80,98	78,54	76,38	76,20
45		94,83	91,26	86,74	84,37	82,87	80,76	79,39
46		94,04	90,20	85,93	84,42	84,19	82,41	81,75
47		94,52	92,72	88,90	85,35	85,38	82,60	82,45
48		95,32	91,42	87,70	85,48	84,37	82,65	82,14
49			94,12					
50			91,61	88,50	76,40			
n.		31	42	35	27	31	23	27
\bar{X}		93,95	90,21	86,02	83,04	81,18	79,19	76,73
DS		1,48	1,91	2,08	2,78	3,02	2,84	3,52
ES		0,27						

TABLA N° 2 - PESOS EXPERIMENTALES EXPRESADOS EN TANTO POR CIENTO, NOS INDICA EL TANTO POR CIENTO DE PESO CONSERVADO EN CADA DÍA DE AYUNO.

III. d. METODOS COLORIMETRICOS.

III. D. 1. Glucemia.

Ya se sabe de hace bastantes años que la sangre contiene otras sustancias reductoras además de la glucosa y que pueden estar presentes en tal cantidad que sean capaces de modificar los valores de la glucosa sanguínea.

Benedict publica en 1931 que la fracción sacaroidea (fracción reductora de la sangre que no es glucosa) de la sangre normal está constituida por glutatión y ácido glucurónico.

Los distintos métodos empleados para la determinación del azúcar sanguíneo difieren en su especificidad para la glucosa y por consiguiente tiende a dar valores diferentes, a veces son ligeras diferencias, a veces estas son pronunciadas. Pero bien es cierto que los métodos clásicamente conocidos se fundamentan en la propiedad que tiene la glucosa, en solución alcalina caliente, de reducir ciertos iones metálicos, así mismo en ellos se realiza una previa precipitación de las proteínas y en la última fase de la determinación se determina cuantitativamente esa reducción como consecuencia de la glucosa presente, bien por un método colorimétrico ó por titulación yodométrica.

Así Folin Wu en los años 1920, 1926 y 1929, ha examinado críticamente y perfeccionado un método que lleva su nombre y que utiliza como reactivo desproteinizante ácido tungstico; como agente oxidante una solución cúprica alcalina y como sustancia desarrolladora de color una solu

ción de ácido fosfomolibdico. (96).

En el método de Benedict, el desproteinizado (para lo que utiliza un filtrato tungstomolibdico) se trata con un reactivo cúprico al que se añade bisulfito sódico al 1 por 100 para eliminar el efecto de las sustancias reductoras que no sean glucosa.

La cuantificación de la glucosa se hace valorándola con un reactivo de color consistente en una mezcla compuesta de 150 gramos de ácido molibdico y 74 gramos de carbonato sódico anhidro disueltos en 500 ml. de agua, mezcla que una vez hervida se filtra, lavando éste filtrado con agua hasta obtener un volumen de 600 ml. al cual se le añade 300 ml. de ácido fosfórico al 85 por 100 se enfria y se diluye hasta un litro.

Estos dos procedimientos arriba mencionados utilizan para la cuantificación de la glucosa, tres diluciones de azúcar de concentraciones conocidas (patrones), preparados a partir de una solución madre de glucosa al 1 por 100 en una solución saturada de ácido benzoico, soluciones que se obtienen diluyendo con agua en las proporciones necesarias y que convienen sean de reciente preparación. La solución madre debe prepararse pesando una glucosa comercial de la máxima pureza.

El cálculo de la concentración puede hacerse igualmente tanto en el método de Flin Wu, como en de Benedict, mediante una valoración colorimétrica en relación con el patrón cuya concentración más se aproxima a la de la sangre objeto de determinación en cuyo caso pueden usarse tanto el colorímetro de Pulfrich como el de Duboscq, pero a menos que la lectura del patrón utilizado y de la incógnita se encuentren

a unos milímetros una de otra, los resultados obtenidos por medio de éste cálculo resultan algo incorrectos ya que el color no es rigurosamente proporcional a la concentración de glucosa, necesitando incluir un factor de corrección de terminado en cada laboratorio. De mayor exactitud es el empleo de una valoración fotolorimétrica, en la cual solo se necesita tener unas concentraciones conocidas de glucosa que nos sirven como curva patrón, efectuándose la lectura a 420 nm. y con una cubeta de 1 cm. de paso de luz; en estas condiciones se observa que por el método de Folin Wu se sigue la ley de Beer hasta aproximadamente la concentración de 400 miligramos por 100 de glucosa sanguínea y por el método de Benedict hasta unos 500 miligramos por 100 ml. de azúcar.

Como métodos que utilizan la titulación yodométrica de la sustancia reductora presente (glucosa) se conocen:

El método de Somogy, 1930 perfeccionado posteriormente en el año 1945 por el mismo autor (97).

Este procedimiento utiliza como agente precipitante de las proteínas una mezcla de sulfato bórico y sulfato de zinc alcalinizada con NaOH 0,5 N. y el filtrado se trata a continuación con un reactivo de cuprotartrato alcalino que por su elevado contenido de sulfato sódico y la ausencia de yodo no permite que el óxido cuproso se reoxide.

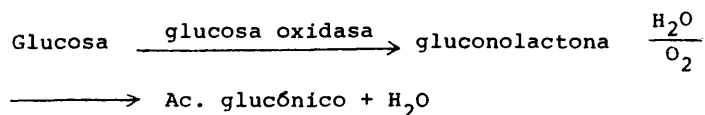
La titulación se efectúa con tiosulfato sódico 0,005 N. usando como indicador el almidón.

En el método de Hagedörn y Jesen, 1923, (98) se precipitan las proteínas con hidróxido de zinc en caliente, posteriormente el filtrado (también en caliente) se trata

con ferricianuro potásico, calculándose la cantidad de éste reducida añadiendo una solución de yoduro y titulando el yodo liberado con íosulfato de sodio .

El método de la orto toluidina descrito por Hutman en 1959, (99), se basa en la condensación de las aldosas con la orto toluidina en ácido acético glacial, con producción de una coloración de color verde que puede medirse fotométricamente. La rapidez, sensibilidad, precisión y sencillez junto a la especificidad de la hexosa, lo convierten en un método manual ideal. Los valores obtenidos por éste método son comparables a los resultados obtenidos por el procediimiento del ferrocianuro.

Los métodos enzimáticos para la determinación de la glucosa son lo de mayor especificidad en la determinación de glucosa a ácido glucónico a peróxido de hidrógeno según la reacción:



El peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxiidasa se determina en presencia de una peroxidasa que cataliza la transferencia de O_2 del peróxido (H_2O_2) a un aceptor cromogénico de O_2 (100) . (101) .

Nosotros hemos elegido en este trabajo experimental el método de la orto toluidina por adaptarse mejor a los medios de nuestro laboratorio y ser una técnica en la que las numerosas curvas patrones que tenemos realizadas nos dá suficiente conocimiento para aceptar la iabilidad de los resultados que con ella obtenemos.

Hemos realizado la medida de la glucosa en suero, antes de haber pasado media hora de la retracción del coágulo, para disminuir en lo posible la glucolisis que experimenta la glucosa en contacto con las células.

Las curvas patrones preparadas son de concentraciones: 50 mg %, 100 mg %, 150 mg % y 400 mg % 100 ml.

En cada determinación se ha incluido además de la curva patrón arriba enumeradas un suero control que nos ha permitido conocer la exactitud del análisis realizado.

Con los valores experimentales obtenidos con las distintas concentraciones de la curva patrón, hemos realizado un ajuste lineal a fin de conocer las concentraciones reales de las muestras analizadas.

III. d. 2. Determinación de Lípidos totales.

La mayor parte de los métodos que se han venido realizando hasta utilizar la reacción de la sulfo-vainillina, de forma generalizada, se han basado en métodos extraactivos, realizándose en primer término la preparación de estos y luego la valoración propiamente dicha.

En ello la extracción se verifica empleando los llamados solventes de las grasas como el alcohol, actona, cloroformo etc.

Una de las técnicas más utilizadas es la descrita por Bloor (1943), (102) que emplea el alcohol etílico ó la mezcla alcohol-éter en la proporción de 3:1. Señala Bloor que en el caso de realizar la determinación en sangre no es necesario una extracción completa sino una distribución homogénea de los lípidos entre la parte líquida y el precipitado dado que se utiliza una fracción de la primer

Debido a la simplicidad y exactitud del procedimiento, la determinación de los lípidos totales en suero por la reacción de la sulfo-fosfo-vainillina, según el método descrito por Zollner (1962), (103) es hoy usado normalmente para estudiar los desórdenes metabólicos que afectan al metabolismo lídico.

El reactivo de color utilizado es una mezcla de ácido fosfórico 11,9 M. y vainillina 0,008 molar, que se prepara según la técnica de N. Zollner y D. Ebarhagen (1965).

En nuestras determinaciones experimentales hemos introducido una curva patrón de concentraciones 500 mg/100 ml.,

750 mg/100 ml., y 1000 mg/100 ml. para efectuar el ajuste li
neal de los sueros problemas, así como un suero control que
nos permita calibrar la exactitud de la metódica por nosotros
utilizada así como la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Igualmente que para los demás parámetros estudiados he
mos obtenido los valores normales de lípidos totales en suero
de ratas en el Handbook of biological data siendo el interva
lo normal entre 70 a 415 mg/100 ml con un valor medio de 230
mg/100 ml.

III. d. 3. Determinación del colesterol.

Revisión de métodos: Según Zak et col. 1954 (104), el colesterol reacciona con el cloruro férrico y ácido sulfúrico concentrado, con formación de un color rojo estable. Un método similar fué el descrito por Searcy y Bergquist, 1960 (105), pero con la modificación de usar sulfato ferroso en lugar de cloruro férrico.

Weller, 1962 (106), ha modificado éste método posteriormente al estudiar las fuentes de error que proporciona, así como ha discutido en su trabajo los varios métodos de determinación de colesterol en función de la exactitud de los resultados obtenidos.

Como método muy aceptado para la determinación del colesterol total en sangre, se reconoce en el método de Schoenheimer y Sperry (1934), (107) y adaptado por Sperry y Brand (1943), (108) basado en la precipitación del colesterol, previa saponificación, con digitonina y valoración posterior del digitónido formado por la reacción de Liebermann.

En el método de Leiboff (1942), (109) la sangre oxalatada se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se extrae con cloroformo en un tubo de ensayo con un refrigerante de aire. Parte del cloroformo se trata por anhídrido acético y ac. sulfúrico para determinar el colesterol total por la reacción de Liebermann.

En nuestro trabajo experimental hemos utilizado el método de Liebermann-Burchard, según la modificación descrita por R.J. Henry (1964), (110) basado en que el colesterol, reacciona a temperatura ambiente con ácido y anhídrido acético en

presencia de ácido sulfúrico concentrado con formación de un compuesto de intenso color verde (fig. nº 9) .

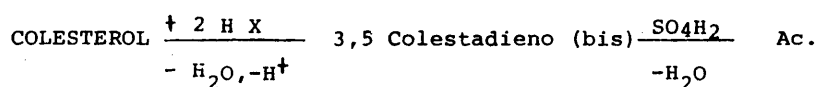
La reacción es muy sensible, siendo necesario tener un excesivo cuidado en la limpieza del material de vidrio utilizado, y no se deben usar en ella los sueros muy hemolizados.

Aún cuando según se acaba de decir no hemos utilizado una técnica enzimática ó semienzimática para la determinación del colesterol total en nuestros sueros problema, no por ello hemos de dejar de mencionar los actuales métodos que basándose en la saponificación alcalina de los ésteres colesterínicos determinan posteriormente la colessterina libre mediante el enzima colessterinoxidasa y de los que hare una revisión Van Gent C. M. y col., 1977. (111).

Las determinaciones de colesterol en este trabajo se han hecho introduciendo una curva patrón, con la que hemos hecho un ajuste lineal por el método de los mínimos cuadrados, a fin de ajustar a él los datos obtenidos con los sueros analizados cada día; así como en cada determinación se ha intoducido un suero control y las determinaciones se han practicado por duplicado.

Según los datos obtenidos del Handbook of biological data. III. g. pag. 53, las cifras normales de colesterol en las ratas oscilan entre 56 y 76 mg/100 ml. como límite mínimo y máximo respectivamente.

Colesterol (posibles reacciones de color en su determinación; citadas en el libro de Prácticas de Bioquímica y Fisiología editado por el profesor J. Tamarit (1977) Editorial Marván).



Biscolestadienil monosulfónico (color verde).

(REACCION DE LIEBERMANN BURCHARD)

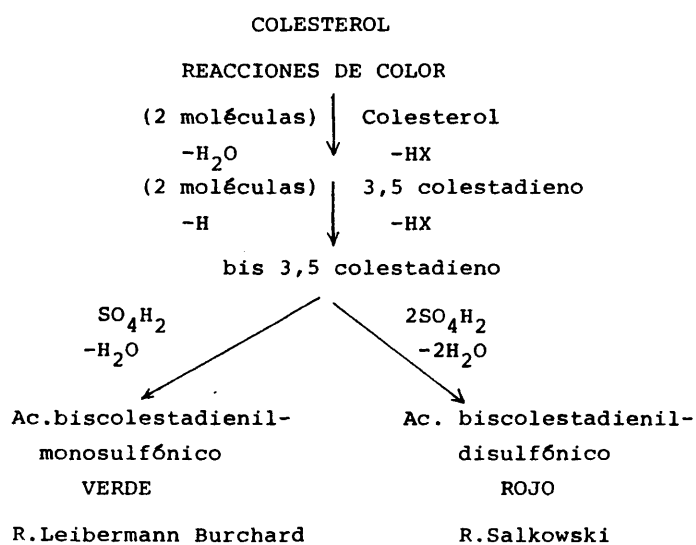


FIG. 9

III. d. 4. Acidos grasos libres.

Revisión de métodos.- Siendo los ácidos grasos los compuestos comunes a todos los lípidos, a los cuales les dan sus principales características físicas y químicas, al estado libre (FFA) sólo se encuentran en pequeña cantidad, aún cuando se ha demostrado tienen un papel central en el metabolismo energético. Dole (1956) (112).

El método más utilizado para determinar los ácidos grasos libres plasmáticos ha sido el método de Dole (94). Las probables interferencias del ácido láctico en su determinación y algunas modificaciones han sido descritas por D.L. Trout y col. (1960) (113).

Un método más específico y laborioso ha sido el de Gordon y col. (1957) (114), en el que las muestras de plasma se desecan por congelación. En ambos métodos la valoración cuantitativa de los FFA plasmáticos se hace por titulación del residuo obtenido en la extracción lipídica del plasma.

El método de Duncombe, más moderno (1964) (115), es un método colorimétrico practicado con una solución clorofórmica de los ácidos grasos plasmáticos. Es éste una modificación del método de Dole antes mencionado, cuyo autor nos describe que por este método se obtienen valores de FFA algo más bajo que por el método de Gordon, al que tomó como estandar de trabajo, y supone sea debido a la incompleta liberación de los ácidos grasos de su ligazón a las proteínas plasmáticas, y que así mismo pueden interferir los fosfolípidos del plasma.

Así mismo nos habla el autor de éste método de que una posible variación de los resultados por él obtenidos respec

to al método de Gordon sean las diferencias que producen en su valoración los ácidos grasos de cadena larga.

A los métodos extractivos (Dole, Gordon, D.L. Trout), se les puede hacer las siguientes objeciones: en primer lugar la lentitud de su realización, y en segundo lugar hay que destacar que después de la extracción de los lípidos sería conveniente una atmósfera de nitrógeno sobre ella a fin de que no se oxiden los ácidos grasos allí presentes.

En cuanto al método de Duncombe arriba mencionado, tiene ciertas ventajas sobre los anteriores como son:

La cantidad de muestra que requiere es menor que para los otros métodos, así como es el único que no necesita la previa extracción de lípidos del plasma.

Anstall y Trujillo (1965) (116), han modificado el método de Duncombe en orden a eliminar la interferencia de los ácidos grasos de cadena corta, tales como el ácido láctico y también los fosfolípidos aún cuando no han delimitado el tiempo que tiene que transcurrir entre la toma de las muestras, su separación y análisis, ni de la temperatura de refrigeración, lo cual puede influir en la fosfolipidosis que se observa elevando los niveles de FFA obtenidos por este método según han observado P.J. Howoeth (1966) (117).

Nosotros hemos seguido en la valoración experimental de los ácidos grasos libres del plasma de las ratas la técnica seguida por Duncombe W.G.

Como reactivos se utilizan:

Una solución de cobre preparada de la forma siguiente:

nueve volúmenes de solución acuosa de trietanolamina 1 molar, 1 volumen de ácido acético 1 N., y 10 volúmenes de una solución de $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ a una concentración de 6,45 % (p/v).

El reactivo Dietilditiocarbonato al 0,1 % (p/v), preparada a partir de dietilditiocarbonato en butanol.

La curva patrón para la calibración del método se ha hecho con una solución de ácido palmítico en cloroformo a unas concentraciones de 0,25 meq/l., 0,50 meq/l., y 1 meq/l., usando esta última como solución madre para preparar las otras dos.

Con ella al igual que hemos hecho en las anteriores determinaciones analíticas se ha hecho el ajuste lineal por el método de los mínimos cuadrados con el fin de calcular por él los valores obtenidos con nuestros sueros problema.

III.d.5-Procedimiento del cálculo.

En las determinaciones bioquímicas que hemos practicado, las concentraciones de las muestras problemas se han calculado a partir de la curva patrón de cada uno de los parámetros plasmáticos estudiados.

Con los valores obtenidos para las soluciones patrón, hemos intentado hacer un ajuste lineal por el método de los mínimos cuadrados y estudiar el coeficiente de correlación entre absorbancias y concentraciones. El coeficiente de correlación "r" se calculó a partir de la fórmula de Pearson:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \cdot \sqrt{n \sum y^2 - (\sum y)^2}}$$

Demostrada como veremos más adelante la relación lineal entre absorbancia y concentraciones, definiremos la ecuación de la recta ($y = ax + b$) de regresión para cada una de las determinaciones practicadas ó línea de ajuste óptimo respecto a la cual la suma de los cuadrados de los errores de predicción se hace mínimo..

Siendo el valor de "a".

$$a = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{\sum y - a \sum x}{n}$$

para todos los cálculos realizados nos hemos valido de una calculadora Canon Cannola 167-P.

En las figuras n^{os} 1,2,3 y 4 representamos las curvas patrón obtenidas para cada uno de los parámetros séricos de terminados.

Hemos esquematizado en el cuadro n^o 8 las curvas patrón de las cinco determinaciones de glucemia practicadas.

CUADRO N^o 8.

Día 1	día 2	día 3	día 4	día 5	
50mg/100ml	50mg/100ml	50mg/100ml	50mg/100ml	50mg/100ml	
100 "	100 "	100 "	200 "	100 "	
150 "	150 "	150 "	300 "	150 "	
400 "	400 "	300 "		400 "	
r	0,99960	0,99930	0,889466	0,968666	0,99885
a	289,11	232,81	195,9771	486,69857	592,9989
b	-3,1735	+6,4161	-10,717296	-2,115048	-12,4293449

Asimismo el cuadro n^o 9 nos detalla los valores hallados en el ajuste lineal practicado con cada una de las curvas patrón que se han introducido en las determinaciones de lípidos totales.

De la misma forma en los cuadros n^{os} 10 y 11 están representados los ajustes lineales de las curvas patrón de colesterol y de ácidos grasos libres respectivamente.

CUADRO N° 9.

Día 1	dia 2	día 3	día 4	día 5	
(mg/100 ml)					
200	200	375	375	187,50	
300	400	750	750	375,00	
750	750	1000	1000	750,00	
r	0,999811	0,999139	0,998465	0,99966	0,997 745
a	1,956,8234	1.709,3817	1.365,578841	2.481,84	2.629,475 983
b	-14,411122	-4,695531	-57,483281	20,666	-156,060 379

CUADRO N° 10.

50 mg/100 ml	50 mg/100 ml	100 mg/100 ml	50 mg/100 ml	
100 mg/100 ml	100 mg/100 ml	150 mg/100 ml	100 mg/100 ml	
200 mg/100 ml	200 mg/100 ml	300 mg/100 ml	200 mg/100 ml	
r	0,999177	0,99966	0,99974	0,99967245
a	715,373059	795,735998	1427,9956	891,36177
b	0,871614	-7,1233	17,4428	-14,274525

CUADRO N° 11.

0,125mg/1	0,125mg/1	0,125mg/1	0,125mg/1	0,125mg/1	
0,250 "	0,250 "	0,250 "	0,250 "	0,250 "	
0,500 "	0,500 "	0,500 "	0,500 "	0,500 "	
		1.000 "	1.000 "	1.000 "	
r	0,999686	0,999592	0,9992005	0,997840	0,999155
a	2,883693	3,354896	7,030495	5,166387	2,284221
b	-0,191833	-0,151068	-0,117769	-0,238528	-0,059069



Hemos de destacar, que en las determinaciones practicadas se ha introducido un suero control, así mismo analizado por duplicado, que nos ha permitido conocer la exactitud de nuestras técnicas analíticas así como su reproductibilidad; en todos los casos el suero control ha sido un suero humano de valores normales según las metódicas empleadas.

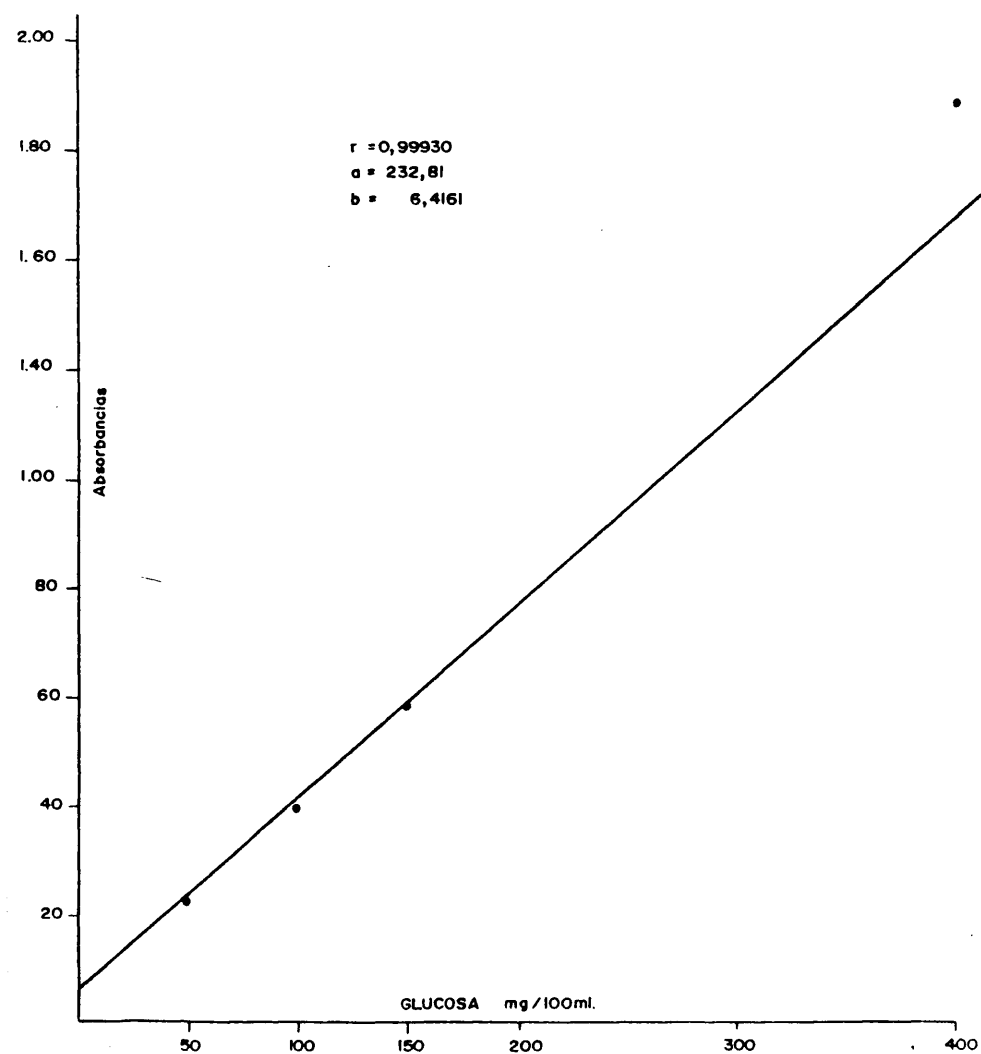


Fig nº 10.- VALORES TEORICOS CON UNA CURVA PATRON DE GLUCOSA AJUSTADA LINEALMENTE.

114

$r = 0,99923$
 $a = 3,214,3288$
 $b = 279,4620$

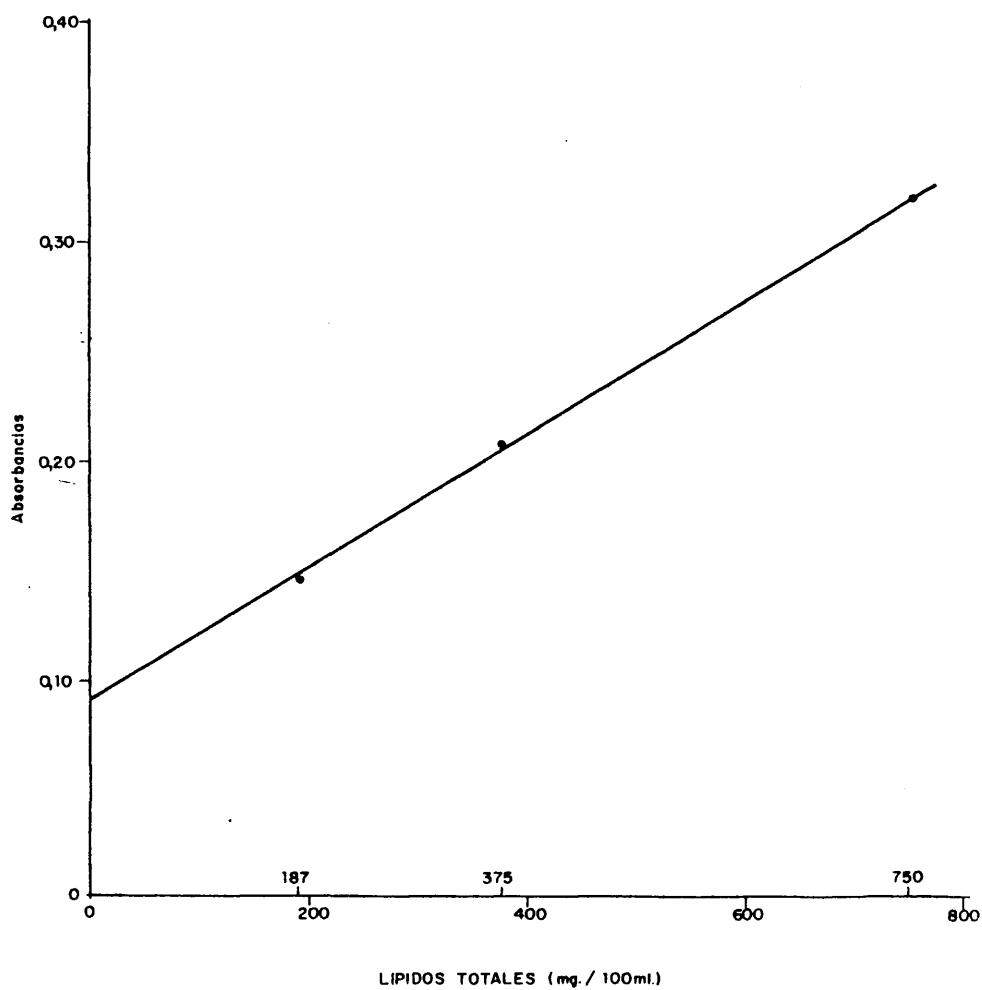


Fig. n°11.- VALOR TEORICO DE UNA CURVA PATRON DE LÍPIDOS TOTALES, AJUSTADA LINEALMENTE

$r = 0,99974$
 $a = 1427,9956$
 $b = 17,4428$

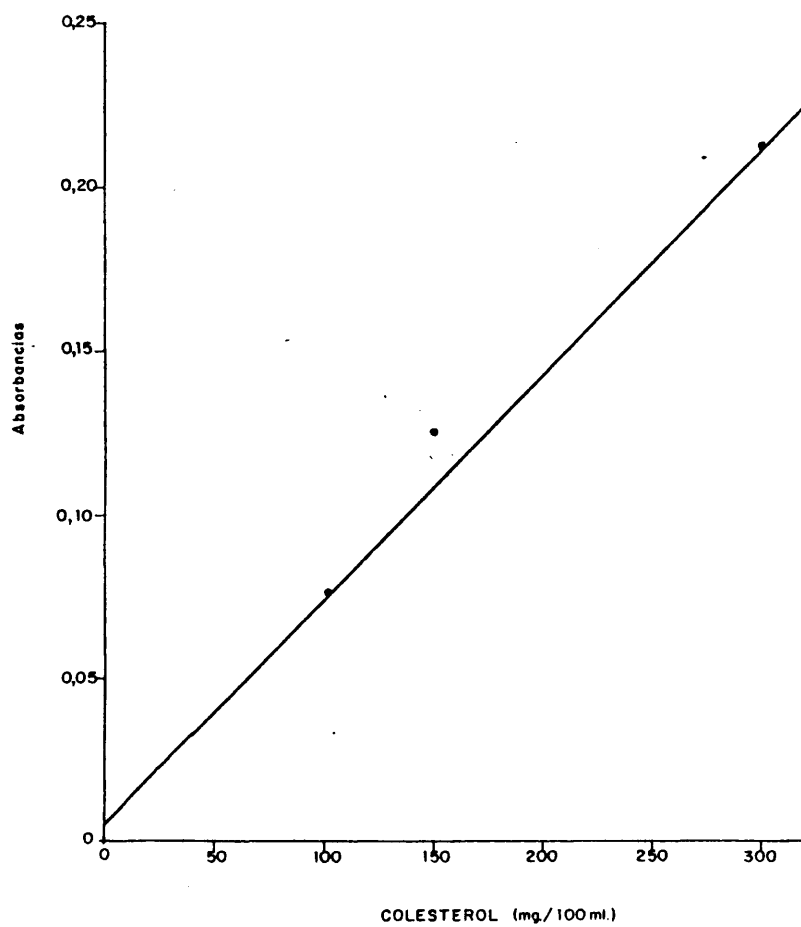


FIG Nº12 - MEDIDA DE COLESTEROL. - CURVA PATRON AJUSTADA LINEALMENTE.

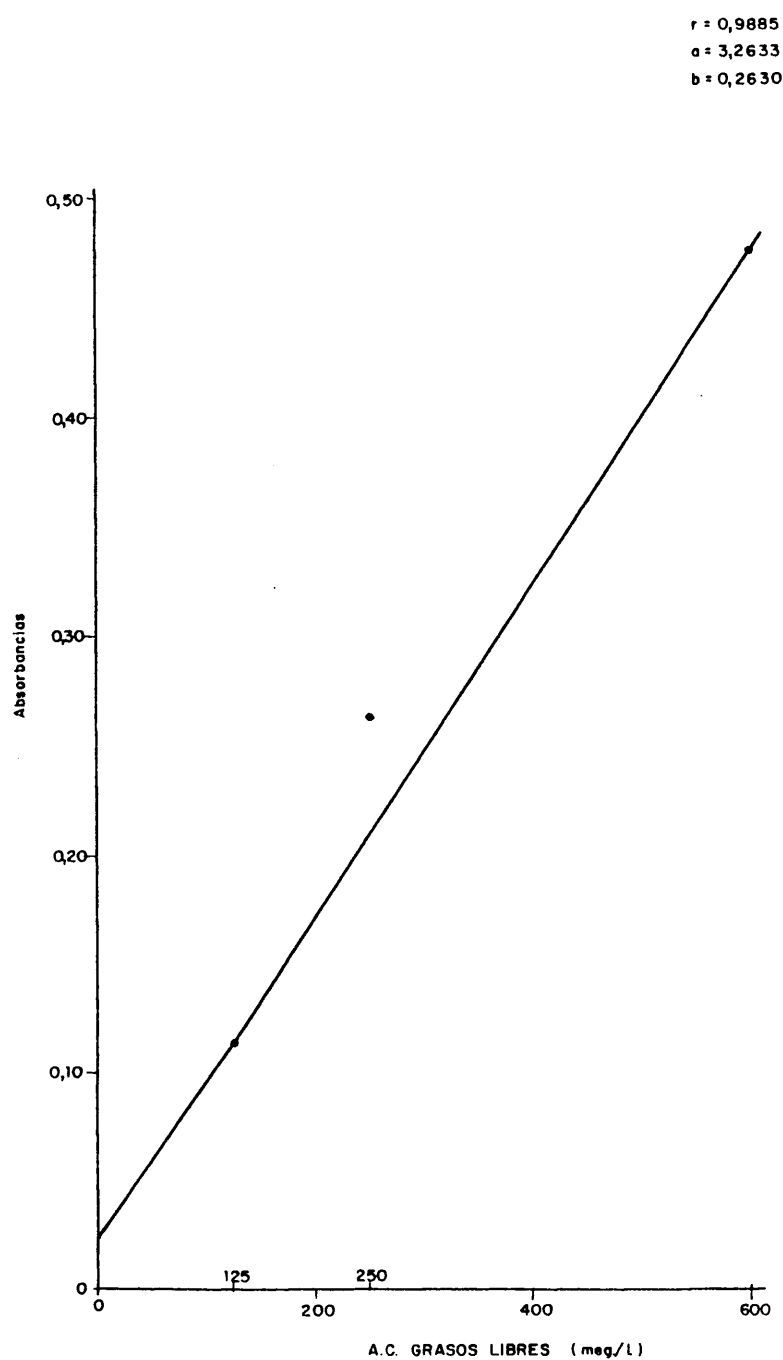


Fig. n° 13.- MEDIDA DE A.C. GRASOS LIBRES.- CURVA PATRON AJUSTADA MEDIANTE UNA CORRELACION LINEAL.

DETERMINACION DE INSULINA

III. c. 1.- Método radioinmunológico (I R I).

La Insulina, hormona contenida en los gránulos de las células beta de los islotes de Langerhans, como molécula de naturaleza proteica que es, tiene la propiedad de inducir una respuesta inmunológica en los animales a los que se le inyecta, dando como resultado final la aparición en el suero del animal inmunizado gammaglobulinas que contienen anticuerpos anti-insulina; si la Insulina utilizada en la inmunización del animal ha sido la Insulina humana, obtendremos anticuerpos anti Insulina humana.

Desde que Brugsh y Horster (118), publicaron en 1930 el primer trabajo para determinar de un modo indirecto el contenido de Insulina en suero, muchos han sido los intentos para conseguir un método que reúna absoluta especificidad y un alto grado de sensibilidad necesarias para medir las pequeñísimas cantidades de Insulina presentes en la sangre.

Podemos hacer una clasificación de los distintos métodos utilizados para la determinación de Insulina en tres grupos: métodos "in vivo", métodos "in vitro" y métodos inmunológicos.

Los métodos "in vivo", están basados en el efecto que produce la inyección de un suero problema a los animales de experimentación, comparando posteriormente estos resultados con los obtenidos utilizando una solución conocida de Insulina.

Los métodos "in vitro", se basan en el efecto que produce el suero problema sobre piezas de tejido aislado e incubado.

Y por último, aprovechando la propiedad de las moléculas proteicas arriba mencionada de inducir la producción de anticuerpos en los animales a los que se les inyecta, así como unido al hecho de que un incremento de la Insulina libre, produce un descenso proporcional de la Insulina ligada a los anticuerpos, permitió a YALOW y BERSON (New York, 1959) (119), desarrollar el método radioinmunológico para la cuantificación de la Insulina circulante en un ser vivo.

Los distintos métodos radio-inmunológicos que posteriormente se han descrito difieren en cuanto a la separación de la Insulina libre y la ligada, ya que mientras los autores mencionados utilizaron con este fin la electroforesis, otros emplean la precipitación con un segundo anticuerpo ó separan con resinas de recambio iónico ó carbón activado.

No es la intención de este trabajo experimental hacer una descripción exhaustiva de los diversos métodos radioinmunológicos para la determinación de Insulina plasmática; por lo que pasamos a describir las distintas etapas que se han ido sucediendo en el método radioinmunológico empleado por nosotros:

En primer lugar marcamos la Insulina siguiendo el método de Greenwood y Hunter (120) utilizadno 2 mC. de I^{125} .

La segunda fase consiste en poner a reaccionar la Insulina marcada I^{125} con los anticuerpos y el suero problema, después de haberla purificado.

Como antisuero se usó GP-1, para la valoración de In su li na en plasma.

La tercera fase comienza con la separación de la Insu li na libre de la ligada a los anticuerpos, y termina con la medición de la radioactividad con el contador de radia ci ón gamma.

En la cuarta fase, y valiéndonos de una curva estan dard, calculamos el contenido de Insulina, expresándolo en milimicrounidades (μ U/ml) por centímetro cúbico.

Las muestras de suero que hemos obtenido para llevar a cabo la determinación radioinmunológica de Insulina fue ron mantenidas a 4°C y centrifugadas a esta temperatura en cámara fría una vez lograda la retracción del coágulo. A continuación se congelaron a -20°C hasta el momento del aná li si s.

Vamos a pasar a describir a continuación las distintas etapas del radioinmunoanálisis de Insulina.

1.- Marcaje de Insulina con I^{125} .

Se ha utilizado Insulina porcina cristalina libre de glucagón, utilizándose la técnica de yodación de Hunter y Greenwood (1962) (120). Esta técnica se basa en la oxidación por la Cloramina T del yoduro radioactivo en yoduro atómico, que a su vez se introduce en uno de los Carbonos del ani llo bencénico de alguno de los cuatro restos de tirosina de la cadena A (restos 14 y 19) ó B (restos 16 y 26) de la insulina por ci na. La acción oxidante de la Cloramina T se detiene al cabo de 30 segundos mediante la adición de meta bi sul fi to. La insulina marcada se separa de los productos

de la reacción mediante una filtración del producto marcado a través de una columna de Sephadex G-25.

Para preparar la columna se usa una columna de vidrio de 50 x 0,9 cm. en la que se introduce un gel: Sephadex G-25, suspendido en una sol. tampón de glicina 0,2 M (pH 8,8). La columna se equilibra durante 1 ó 2 horas con glicina 0,2 M conteniendo 0,5 % de albúmina humana.

Seguidamente se añade 1 ml. del producto marcado en el extremo superior de la columna y se mantiene la filtración con el mismo tampón de glicina 0,2 M.

Los eluidos se recogen en fracciones de 1 ml. cada uno y se mide la radioactividad de los mismos.

Antes de añadir 1 ml. del producto marcado conviene saturar la columna con albúmina al 20 %, con ello se consiguen dos objetivos: primero saturar con albúmina las paredes de vidrio y evitar con ello que la muestra se pegue a las paredes y segundo, calcular el volumen muerto de la columna. Todo el proceso se realiza en la cámara fría para evitar de gradación de la hormona.

Materiales:

- Tampón fosfato 0,5 M (pH=7,5). Se preparó mezclando una solución 0,5 M de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}.12 \text{ H}_2\text{O}$ (17,907 g.%) y otra solución 0,5 M. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (6,8045 g.%), hasta conseguir un pH=7,5.

- Tampón fosfato 0,05 M (pH=7,5). Se preparó por dilución al 1/10 de la solución tampón anterior.

- Cloramina T (Merck) al 0,4%; 24 mg. de metabisulfito se disuelven en 10 ml. del tampón fosfato 0,05 M.

- Yoduro potásico (Merck) al 1%: se disuelven 10 g. en 1 ml. del tampón fosfato 0,05 M.

- Tampón de glicina 0,2 M. (pH=8,8); se pesan 30 g. de glicina y se disuelven en unos 900 cc. de agua bidestilada. Se ajusta el pH de la solución con ClH 1 N. hasta el valor indicado y se completa con agua destilada hasta 1 l. De este modo se ha preparado la Glicina 0,4 M. y a partir de ella con una dilución al 50% se obtiene a la concentración de 0,2 M.

- Albúmina al 20%. Se disuelven 2,4 g. de albúmina bovina purificada en 12 ml. del tampón de glicina.

- Insulina porcina cristalizada, 0,5 mg/ml. en ClH 0,03 N. Esta solución acidificada de insulina es estable incluso a temperatura ambiente durante meses. Parte de ella se repartió en fracciones de 0,5 ml que se guardaron a -20°C que se fueron utilizando para sucesivos marcajes. Otra parte se diluyó con tampón, hasta una concentración final de 0,01 mg. de insulina/ml a -20°C que se fueron utilizando sucesivamente para preparar las diluciones de la Insulina fría para la curva de calibración de cada IRI.

- Columna de Cromatografía (Pharmacia Fine Chemicals) de 0,5 cm. de diámetro interno por 30 cm. de altura. Se utilizó como soporte gel de Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals) que se dejó previamente hidratarse con agua bidestilada durante 24 horas. Después se llenó la columna con gel hasta una altura de unos 23 cm. de tampón, a continuación se añadió a la columna 0,2 ml. de albúmina bovina puri

ficada para saturar el vidrio; con objeto de que durante la cromatografía de la Insulina marcada ésta no se adhiera a las paredes de la columna. La albúmina sirvió además para determinar el "volumen vacío" de la columna (volumen de la fase móvil):

Después de añadir 0,2 ml. de la solución al 20 ml. de la solución al 20% de albúmina sobre la superficie del gel en la columna se dejó gotear ésta recogiendo fracciones de 0,7 ml. (unas 10 gotas) con la ayuda de un colector de fracciones regulado para conteo de 10 gotas por tubo. Se recogieron 100 fracciones determinándose en cada una de ellas la concentración de albúmina por el método de Lowry y col. (1951). El volumen vacío de la columna corresponde al volumen de elución de la albúmina, cuyo peso molecular es superior al límite de exclusión del Sephadex G-25, que tiene un intervalo de fraccionamiento entre 1.000 y 5.000 de peso molecular (J.Curling, 1970). En este tipo de gel la insulina marcada se eluye de la columna en la misma localización que la albúmina.

Método:

La reacción para el marcaje de insulina se realiza en el vial que contiene el yodo radioactivo (I^{125}) adquirido de la firma Amersham, a una dosis de 2-2,5 milicurios. Al vial se le añaden sucesivamente y en el orden indicado los siguientes reactivos.

A.- 0,025 ml. de tampón fosfato 0,5 M, se agita el vial para mezclar bien el tampón con el yodo radioactivo que viene disuelto en un volumen muy pequeño (1-10 μ l).

B.- 0,05 ml. ($=0,25 \mu\text{g}$) de la solución de insulina porcina cristalizada (0,5 mg/ml).

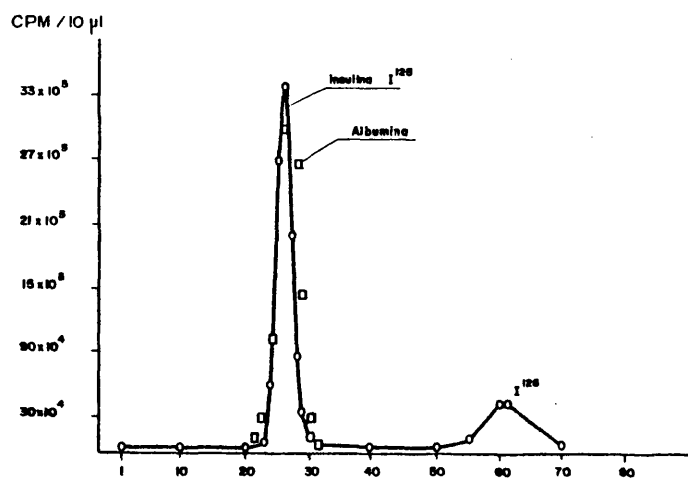
C.- 0,025 ml. de la solución de Cloramina T. Se agita el vial suavemente durante 30 segundos y se añade inmediatamente el siguiente reactivo:

D.- 0,025 ml. de la solución de metabisulfito sódico.

E.- 0,2 ml. de la solución de yoduro potásico.

La mezcla del vial se transfiere cuantitativamente a la superficie de la columna de cromatografía de Sephadex G-25. Se lava el vial con 0,4 ml. de la solución de yoduro potásico, que son transferidos también a la columna y se comienza la cromatografía de la mezcla, eluyendo con tampón barbitál sódico 0,07 M ($\text{pH}=8,6$). De cada una de las fracciones que van saliendo de la columna (unos 0,7 ml.), se toman 10 μl para el conteo de su radioactividad en un contador gamma automático (Nuclear Chicago). El conteo de las fracciones nos revela la separación de dos picos, correspondientes a la Insulina marcada (Insulina I^{125}) el primero que sale y al yoduro radioactivo libre (I^{125}) el segundo (fig.14). Las fracciones correspondientes al pico de Insulina marcada se guardan en el congelador a -20°C hasta el día de su utilización.

A continuación la Insulina- I^{125} obtenida del marcaje ha de ser purificada por cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-75 que permite una buena separación de la Insulina que se ha ido degradando por efecto de las radiaciones gamma del yodo incorporado:



Marcaje de Insulina

FIG. 14 - Separación de I¹²⁵ libre en Sephadex G-25

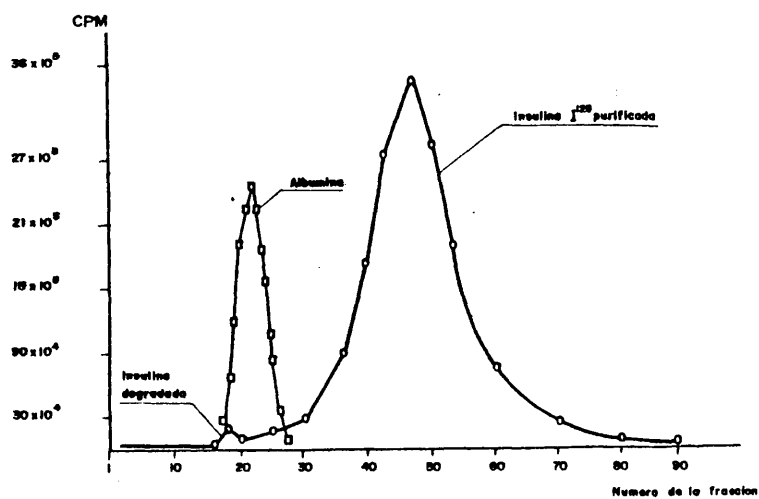


FIG. 15 - Purificación de la Insulina marcada en Sephadex G-75

Material:

- Tampón de glicina 0,2 M (pH=8,8). Se prepara a partir de una solución de glicina, ya preparada, 0,4 M en la dilución 1:2.

- Albúmina al 20%: Se disuelven 2,4 g. de albúmina bovina purificada en 12 ml. del tampón barbital sódico 0,1 M.

- Columna de Cromatografía (Farmacia Fine Chemicals), de 1,5 cm. de diámetro interno y 30 cm. de altura. Se llena la columna con gel de Sephadex G-75 (previamente hidratado durante 24 h.) hasta una altura de 20-25 cm. y se lava con unos 100 ml. del tampón de barbital sódico 0,1 M. a continuación se le añade 0,2 ml. de la solución de albúmina al 20% para saturar el vidrio de la columna e impedir la absorción al mismo de la Insulina y para determinar el volumen vacío.

A los tubos de vidrio utilizados para recoger las fracciones de la cromatografía se les añade 0,1 ml. de la solución de albúmina al 20%.

Método:

Se vacía la columna del eluyente (barbital sódico 0,1 M) hasta la altura de la superficie del gel. Se le añade la cantidad de insulina marcada que se desee purificar (habitualmente 1 ó 2 fracciones de la cromatografía en Sephadex G-25 del marcaje, ó sea 0,7 a 1,5 ml.) con cuidado de no remover la superficie del gel. Una vez que la muestra añadida ha penetrado en el gel se llena la columna con el eluyente y se deja fluir lentamente, recogiendo fracciones de unos 0,7 ml. equivalentes a 10 gotas contadas por

el colector de fracciones. Todo este proceso se realiza en una cámara fría a -4°C . para evitar en lo posible que se degrade la hormona purificada. Terminada la cromatografía se realiza el conteo de la radioactividad de cada una de las fracciones. La cantidad de insulina degradada aumenta a medida que transcurre más tiempo desde el marcaje (fig. 15).

2.- Preparación del anticuerpo.

Como anticuerpo para el ensayo radioinmunológico, hemos utilizado el GP-1 que B.O. Hullman de la Universidad de Umea (Suecia) ha cedido gratuitamente a nuestro Departamento de Fisiología a través del Dr. J.Tamarit Rodríguez, y del que practicadas y ensayadas diversas diluciones, hemos utilizado la dilución final de 1:75.000 por su más exacto funcionamiento en la curva patrón.

III.c 1. a.- Práctica del radioinmunoensayo de insulina.

a) El buffer de análisis utilizado es una solución de Glicina 0,2 M ya descrita anteriormente a la que se le añadió 0,25% de Albúmina humana y 1% de N.S.S. (pH=8,8).

b) El anticuerpo con el que se ha realizado el análisis es GP-1 mantenido a -20°C en un stock de 1 ml. a la dilución 1:100. De este stock, se ha preparado una dilución 1:75.000. El volumen total a preparar (V_t) depende del número de pruebas (n).

$$V_t = (n \times 0,2) \text{ ml}$$

De esta dilución final se pipetearán 0,2 ml. a cada uno de los tubos.

c) Preparación de la insulina: se aconseja utilizar entre 2 y 5 uU de insulina marcada por prueba en un método radioinmunológico. Dado que en nuestro marcaje de insulina nos es prácticamente imposible calcular la actividad específica de la hormona marcada con exactitud, tenemos que expresar la cantidad de Insulina- I^{125} a añadir en cada prueba en CPM. El número de CPM de insulina marcada que tenemos que añadir en cada prueba ha de ser tanteado previamente, después de cada marcaje, realizando varias curvas standard con cantidades diferentes de Insulina- I^{125} . Las CPM que nos da la Insulina marcada de nuestro análisis fueron de 19.200 a partir de 50 pgr. de Insulina- I^{125} .

El volumen total (V) de insulina marcada a preparar depende también del número de pruebas (n).

$$V = (n \times 0,6) \text{ ml}$$

y el número total de CPM de Insulina-I¹²⁵ a diluir en V se calcula de la siguiente manera:

$$CPM_t = (V \times 19.200)$$

Las CPM_t se toman de una solución de Insulina marcada y purificada previamente que contiene un elevado número de CPM y se diluyen hasta V con buffer de análisis.

d) Preparación de las muestras: los componentes de la reacción insulina-anticuerpo se pipetea en un volumen total de 1 ml., en el siguiente orden:

$$\begin{array}{r} - 0,6 \text{ ml. } I^{125} \\ - 0,2 \text{ ml. muestra} \\ - 0,2 \text{ ml. AK} \\ \hline 1 \text{ ml.} \end{array}$$

Una vez pipeteadas todas las pruebas se dejan incubar a -4°C durante 2 días.

e) Preparación de la curva de calibración (curva estándar): la curva de calibración nos sirve para llegar a conocer la relación que existe entre Insulina I¹²⁵ ligada al anticuerpo (H*) y la Insulina fría total que hay en la mezcla (H).

$$C^* = \frac{H^*}{H} C$$

conocida esta relación a partir de los valores obtenidos de la curva de calibración (C_i^{*}, H_i) se puede calcular H en las muestras a partir de los valores de C* en las muestras.

La curva de calibración consiste en la preparación de

una solución de insulina cristalina porcina, libre de glucagón, según las siguientes diluciones:

0,1 ml. (10.000 uU/ml) + 3,9 ml sol. tampón	250 uU/ml
2 ml. (250 uU/ml) + 3 ml sol. tampón	100 uU/ml
0,6 ml. (100 uU/ml) + 0,2 ml sol. tampón	75 uU/ml
0,5 ml. (100 uU/ml) + 0,5 ml sol. tampón	50 uU/ml
0,5 ml. (100 uU/ml) + 1,5 ml sol. tampón	25 uU/ml
0,1 ml. (100 uU/ml) + 0,9 ml sol. tampón	10 uU/ml
0,1 ml. (100 uU/ml) + 1,9 ml sol. tampón	5 uU/ml
sol. tampón	0 uU/ml

Una vez realizadas las diluciones, los tubos de la curva de calibración se preparan por triplicado, según el siguiente protocolo:

- 0,6 ml. I^{125}
- 0,2 ml. estandard
- 0,2 ml. AK

1 ml.

Además se preparan dos tipos de pruebas "control" rotuladas como: pruebas AT y pruebas A.

De las primeras, pruebas AT (actividad total), se preparan 10 tubos y nos permitirán conocer la cantidad total de Insulina- I^{125} añadida a cada prueba, ya que a ellos se les añade anticuerpo.

Las pruebas A (actividad inespecífica), se preparan con:

- 0,2 ml. de muestra
- 0,6 ml. de insulina- I^{125}

Estas pruebas al no llevar anticuerpo y ser toda la insulina libre, nos sirven como control del % de captación.

Una vez pipeteadas todas las pruebas, se dejan incubar a -4°C durante 3 días.

f) Separación de la insulina libre y ligada y lectura de las pruebas: Trás el periodo de incubación arriba mencionado, se procede a la separación de la Insulina- I^{125} libre de la unida al anticuerpo por la técnica de Herbert y col. (121). Esta técnica está basada en la facultad que tiene el carbón saturado con dextrano de absorber selectivamente la hormona radioactiva libre, quedando la unida al anticuerpo libre en el sobrenadante.

Como reactivos se utilizan:

- Carbón activado (Sigma)
- Dextrano T-70 (Farmacia)
- Tampón de glicina 0,2 M (pH 8.8)

Ajuste proteico: El proceso de separación de las dos hormonas, tanto de la ligada al anticuerpo como de la hormona libre, se favorece en general, añadiendo a las muestras una determinada cantidad de proteína que actua como transportador del complejo: hormona radioactiva-anticuerpo. A las muestras de plasma, sin diluir, no se añade suero de carnero, ya que su concentración en proteínas es suficiente. A las muestras que no tienen la concentración mínima de 10 mg/ml como sucede con la curva standard, se les añade suero de carnero en la cantidad suficiente para alcanzarla. (0,2 ml. NSS). El error que se comete de volumen al añadir a la curva patrón el suero de carnero es muy inferior al que se cometería en ausencia del suero, por las razones ya indicadas.

Preparación del complejo Carbon -Dextrano. Se hace una suspensión de Dextrano 70 T al 0,5 % en glicina 0,2 M. A continuación se realiza otra suspensión de carbón en tampón glicina al 1%. Ambas suspensiones se preparan a partir iguales.

La mezcla se mantiene en agitación constante por medio de un sistema magnético. A cada muestra se le añade 0,5 ml. de dicha mezcla: carbón-dextrano y se mantiene en un baño a 4°C durante 45 minutos. Tras este periodo los tubos se centrifugan a 3.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. A continuación se separa por aspiración, mediante una bomba de vacío, el líquido sobrenadante, quedando en el tubo el sedimento de carbón que contiene la hormona radioactiva libre. Seguidamente los tubos se ponen a contar en un contador de partículas gamma automático.

La radioactividad correspondiente a esta fracción, se expresa con relación a la radioactividad total (inicial) de la muestra.

g) Ajuste de la curva de calibración: Con los datos de la radioactividad (C, P, M), de cada uno de los tubos de la curva standard y la concentración conocida de insulina fría que tiene cada uno, puede representarse gráficamente la curva de calibración poniendo en ordenadas las CPM por ml. proporcional a la hormona ligada, y en abcisas la concentración total de Insulina fría presente (uU/ml).

En la figura 16 se representa la curva de calibración que hemos obtenido en nuestro análisis con una concentración de Insulina de 50 mg. Hemos elegido para la realización del IRI la cantidad de Insulina marcada (50 pg.) que proporciona una mayor pendiente inicial a la curva de calibración, que es

aquella zona de la curva en la que vamos a situar la concentración de Insulina de nuestro experimento en el suero de ratas ayunadas durante siete días.

El uso exclusivo de la representación gráfica para el cálculo de la concentración de todas las muestras hace el procedimiento muy tedioso e introduce mayor error en la apreciación. Por ello se ha estudiado la relación entre las dos variables: y = CPM y x = uU/ml de insulina por el método descrito por el profesor J. Tamarit Torres en el 1^{er} Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas realizado en Zaragoza (1975) (122), en el que describe una forma práctica de cálculo de las concentraciones de hormonas por radioinmunoensayo.

Se refiere en él el empleo directo de las curvas experimentales para estimar la cantidad de Insulina no marcada contenida en una muestra (abcisa) a partir de los impulsos por minuto correspondientes a dicha muestra (ordenada).

Se trata de curvas que tienden a un límite superior asintótico a, para concentraciones infinitas de hormonas no marcadas.

Aplicando un razonamiento similar al de Michaelis-Menten, el profesor Tamarit dedujo que estas curvas son hipérbolas de ecuación:

$$(a-y)(x+b) = K \quad (15)$$

donde a tiene el significado ya expuesto arriba y b representa a la porción de la asíntota vertical siendo al igual que k una constante.

El cálculo de los coeficientes de las ecuaciones normalizadas por el método de los mínimos cuadrados y la solución de

dicho sistema de ecuaciones se ha programado en nuestro Departamento por la computadora Wang 2.000 que puede trabajar en línea con el teletipo.

Se mide el ajuste de la curva teórica obtenida de este modo, calculando los valores teóricos (y_t) de los impulsos correspondientes a cada concentración, mediante la fórmula:

$$Y_t = \frac{K}{x+b} + a \quad (17)$$

Los valores obtenidos por este método para nuestra curva estandar son los siguientes:

x	Y_r (real)	Y_t (teórico)	$(Y_r - Y_t) \cdot 10^{-3}$
0	7037.0 \pm 9.9	6474.7	- 0.5622
5	7424.3 \pm 139.1	7227.8	- 0.1965
10	7632.6 \pm 306.0	7879.2	+ 0.2465
25	8964.0 \pm 348.8	9394.8	+ 0.4308
50	10883.8 \pm 381.0	11035.3	+ 0.1514
75	12029.8 \pm 51.0	12085.9	+ 0.0561
100	13040.3 \pm 38.0	12816.5	- 0.2237
250	14743.1 \pm 976.0	14757.7	+ 0.0146

$$\text{Error de ajuste} = \frac{\sum (Y_r - Y_t)^2}{n-3} = 368.12022 \text{ CPM}$$

Los parámetros de la hipérbola ajustada corresponden

a:

$$a = 16.8814041$$

$$b = 64.095572$$

$$k = 667.020281$$

en la fig. 16 se ha representado la curva teórica y los puntos de la curva real comprobándose que el ajuste es bueno

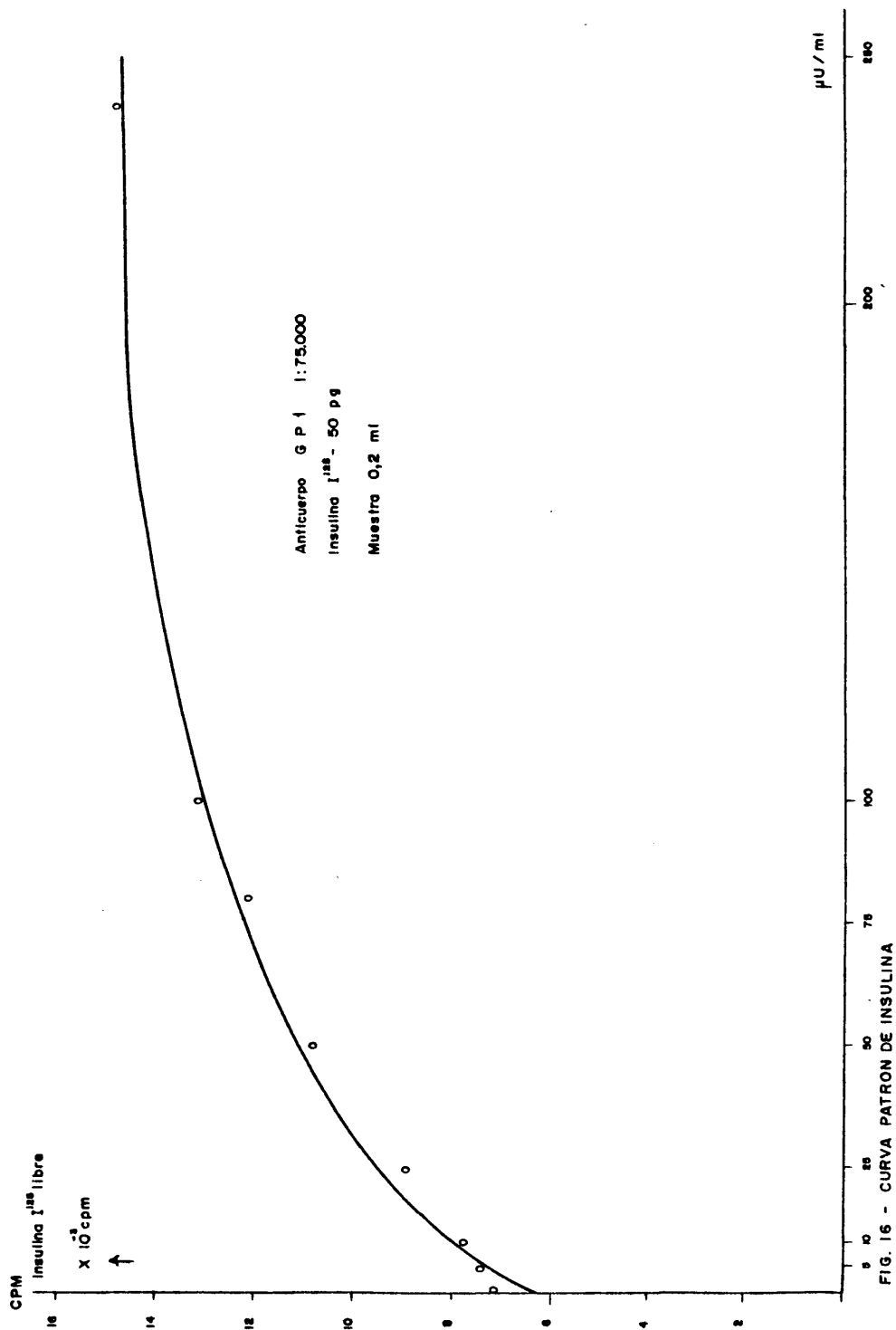


FIG. 16 - CURVA PATRON DE INSULINA

siendo el error de 368, 12022 CPM.

De forma análoga a las transformaciones algebraicas que pueden hacerse con la ecuación de Michaelis-Menten, (ecuación de Lineweaver-Burk y representación de Eadie-Hofster), podemos someter la ecuación de la hipérbola (15) a variaciones que la transformen en ecuaciones lineales, cuya representación gráfica sea una línea recta, obligando a que la abscisa correspondiente a la concentración de 0, μ U/ml. de Insulina (1^{er} punto de la curva standard), se que de fija en esta transformación.

I.- Linearización de Lineweaver-Burk:

Si en (15), hacemos $x = 0$, podemos escribir

$$(a - y_0) \cdot b = k \quad (18)$$

y entre (15) y (18) nos queda

$$(a - y)(x - b) = b(a - y_0) \quad (19)$$

de donde

$$\frac{a - y}{a - y_0} = \frac{b}{x - b} \quad (20)$$

y multiplicando los dos miembros de (20) por $(y - y_0)$ y dividiendo por $(a - y)$ podemos escribir:

$$\frac{y - y_0}{a - y_0} = \frac{x}{x - b} \quad (21)$$

que se puede poner de la forma

$$\frac{a - y}{y - y_0} = \frac{x}{x - b} = 1 + \frac{b}{x} \quad (22)$$

y dividiendo ambos miembros por $(a - y_0)$ queda:

$$\frac{I}{y - y_0} = \frac{I}{y} = \frac{I}{a - y_0} + \frac{b}{a - y_0} \frac{I}{x} \quad (23)$$

expresión que nos permite representar gráficamente los valores inversos de las concentraciones de Insulina ($\frac{I}{x}$), frente a los valores inversos de los impulsos obtenidos (cpm) para cada uno de los puntos de la curva patrón, con la salvedad expuesta anteriormente de hacer pasar exactamente la función lineal que así se obtiene, por el valor inicial experimental (y_0).

II.- Linearización Eadie:

Esta transformación lineal de la función hiperbólica (15), responde a la expresión

$$\frac{x}{y - y_0} = \frac{x}{y} = \frac{I}{a - y_0} x + \frac{b}{a - y_0} \quad (24)$$

dando: esta linearización cuando representamos los valores de las concentraciones de x (insulina fría) en el eje de abscisa frente a $\frac{x}{y}$ en el eje de ordenadas.

x	$\frac{I}{x}$	$\frac{I}{y - y_0}$	$\frac{x}{y - y_0}$
5	0.20000	2.58197	12.90988
10	0.10000	1.67897	16.78979
25	0.04000	0.51894	12.97353
50	0.02000	0.25995	12.99781
75	0.01333	0.20028	15.02163
100	0.01000	0.16657	16.65750

cuya representación gráfica la podemos ver en la fi
gura n° 17.

Si observamos ambas linearizaciones, vemos que la que presenta un mejor ajuste es la que corresponde a la linea
rización de Lineweaver-Burk, que se ha obligado a pasar por el eje de coordenadas al restar a cada punto del eje de ab
cisas el valor correspondiente a las c.p.m. del 1^{er} punto de la curva, siendo su coeficiente de correlación r=0.989605.

Por el contrario la linearización según el método de Eadie, presenta un coeficiente de correlación r = 0.925986; siendo la sumatoria de los errores de ajuste en cuentas por los tres métodos de:

Método hiperbólico	=	83.0 CPM
Método de Lineweaver	=	1049.9 CPM
Método de Eadie	=	1724.4 CPM

lo que nos habla a favor de que el mejor ajuste de la curva
estandard se realiza mediante la hipérbola de ecuación (15),
arriba expuesta.

Cálculo de las concentraciones de Insulina en las muestras:

Una vez ajustada la función con los datos experimenta
les de la curva de calibración, es decir, conocidos ya los
parámetros a, b y k, se puede calcular la cantidad de µU
de Insulina de las muestras mediante la expresión:

$$x (\mu U) = \frac{k}{y-a} - b$$

esta expresión programada para realizarse por la computado
ra Wang 2200, hace rápidamente el cálculo de x a partir de
los valores experimentales de y.

El valor de \underline{x} así obtenido, corresponde al número de μU contenidos en 0,2 ml. de muestra. Para calcular los $\mu\text{U}/\text{ml}$. habrá pues que multiplicar el valor de \underline{x} por 5.

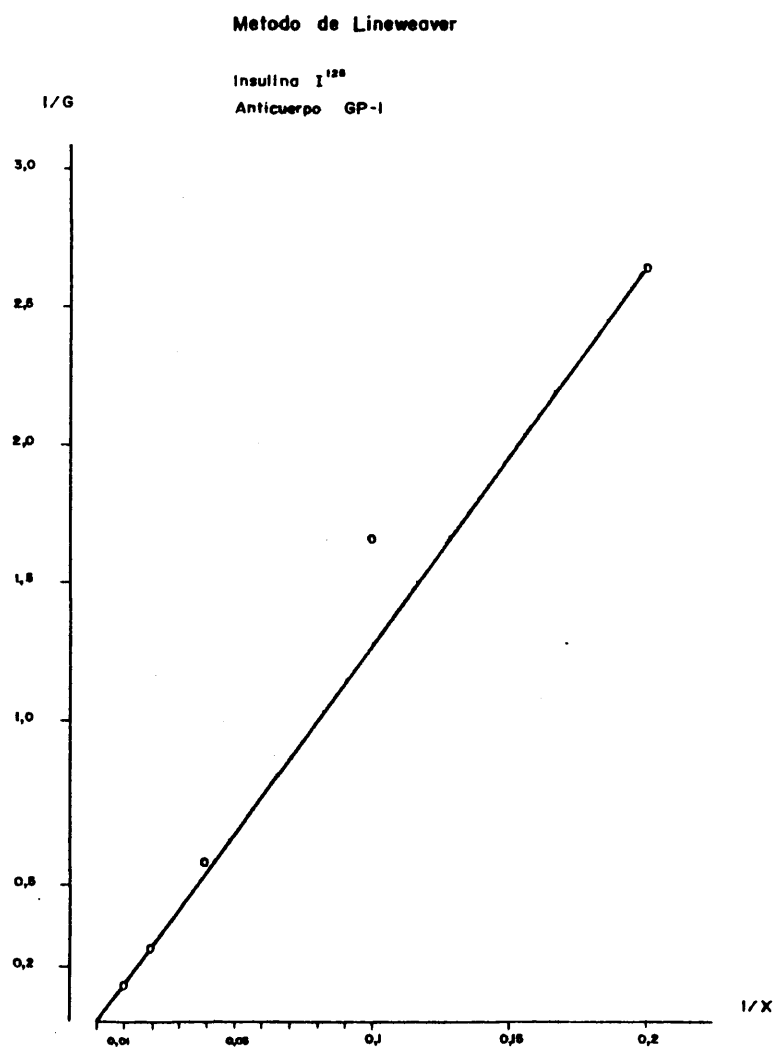


FIG 17 - LINEA RECTA OBTENIDA APLICANDO EL METODO DE LINEWEAVER
AL AJUSTE DE LA CURVA PATRON DE INSULINAS

DETERMINACION DE GLUCAGON

III.d.2.- Método radioinmunológico:

La determinación analítica de Glucagón se hizo para los sueros de ratas sometidas al periodo de ayuno de siete días por el método radioinmunológico descrito originalmente por Yelow y Berson (119), (1960). Su fundamento es esencialmente una reacción de "competición" entre la hormona de la muestra (hormona fría) y una exógena, marcada con I^{125} (hormona caliente), para combinarse con un anticuerpo específico para ellas, tal como hemos descrito en el capítulo dedicado a la valoración de la Insulina plasmática (cap. III.c.1).

Con el fin de evitar la degradación proteolítica del glucagón, como hormona polipeptídica que es y facilmente degradable por enzimas proteolíticos, las muestras de sangre se recogen (1,5 cc.) sobre una solución stock que está en una proporción de 0,1 mL/1 ml. de sangre y cuya composición es de 50% de trasylol (200.000 U. "Bayer"), 50% $ClNa_2$ (0,9%), y 1,2 gr. EDTA.

Recordemos que el trasylol es un conocido inhibidor de fermentos proteolíticos, que evita la degradación del Glucagón (123).

A continuación pasamos a describir la preparación de cada uno de los elementos necesarios para la puesta en marcha de la determinación radioinmunológica del Glucagón.

1.- Marcaje del Glucagón con I^{125} .

Se utilizó Glucagón porcino cristalizado de la firma

Novo. La técnica de yodación empleada es la de Hunter y Greenwood (120). Esta técnica se basa en la oxidación por la Cloramina T del yoduro radioactivo en yodo atómico, que a su vez se introduce en uno de los carbonos del anillo bencénico de alguno de los dos restos de tiroxina de la molécula de Glucagón. La acción oxidante de la Cloramina T se detiene al cabo de 30 segundos mediante la adición de metabisulfito. El glucagón marcado se separa de los productos de la reacción por cromatografía a través de una columna de Sephadex G-25.

Materiales:

- Soluciones tampón:

- Fosfato 0,5 M (pH = 7,5)

$\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ (6,5 gr.)

NaPO_4H

$\text{NaPO}_4\text{H}_2\text{O}$ (0,69 gr.)

disueltos en un volumen total de 100 ml de agua desio
nizada.

- Fosfato 0,05 M (pH = 7,5)

se prepara a partir del anterior por dilución.

- Glicina 0,2 M con 0,5% de albúmina humana (pH = 8,8)

se prepara a partir de Glicina 0,4 M a la que se le
añade albúmina humana, NaOH y H_2O (pag.125).

- Radioactivos:

- Cloramina T

32,2 mg. disueltos en 10 ml. del tampón de fosfato
0,55 M (pH = 7,5).

- Metabisulfito sódico

24 mg. disueltos en 10 ml. del tampón de fosfato
0,05 M (pH = 7,5).

- Ioduro potásico
100 mg. disueltos en 10 ml. del tampón de fosfato 0,05 M (pH = 7,5).
- Glucagón
5 μ g (Beef-Pork glucagón, Eli Lilly) disueltos en 5 μ l de ClH 0,02 N.
- I^{125}
3 mC. La concentración del iodo radioactivo suele oscilar entre 100 y 300 mC/ml.

Método de marcaje:

A los 5 μ l de la sol. de Glucagón (5 μ g) en ClH se le añaden 50 μ l. del tampón fosfato 0,5 M. y se agita.

En una jeringa Hamilton con cateter de nylon, se aspiran de modo sucesivo y dejando entre ellos un pequeño espacio de aire para que no contacten antes de tiempo:

- 50 μ l. del tampón de fosfato 0,5 M.
- 10 μ l. de la solución de Cloramina T (35 μ g).
- 5 mc de iodo radioactivo en un volumen de 10 a 30 μ l.

Bruscamente se deposita el contenido del catéter sobre el vial que contiene el Glucagón. Se agita inmediatamente en Vortex unos 18". Para detener la reacción se añade 50 μ l. de la solución de metabisulfito sódico y 200 μ l de la solución de ioduro potásico. Se agita.

A todo lo anterior se le añade tampón de Glicina 0,2 M on 0,25% de albúmina humana, hasta conseguir un volumen final de 2 ml. Servirá para calcular el tanto por ciento de incorporación.

2.- Purificación del Glucagón- I^{125} .

Una vez obtenido el Glucagón radioactivo se purifica para separar el Glucagón I^{125} del I^{125} libre (fig.15).

Para preparar la columna: se usa una columna de vidrio de 50 x 0,9 cm., en la que se introduce un gel: Sephadex G-25 suspendido en una solución tampón de glicina 0,2 M (pH 8,8). La columna se equilibra durante 1 ó 2 horas con glicina 0,2 M, conteniendo 0,5% de albúmina humana.

Seguidamente se añade 1 ml. del producto marcado por el extremo superior de la columna y se mantiene la filtración con el mismo tampón de Glicina 0,2 M.

Los eluidos se recogen en fracciones de 1 ml. cada uno y se mide la radioactividad de los mismos. Se mantiene eluy yendo la columna hasta obrener los picos ya mencionados, correspondientes a la hormona marcada y el yodo libre (aprx. 100 tubos).

Antes de añadir 1 ml. del producto marcado conviene saturar la columna con albúmina al 20%, con ello se consiguen dos objetivos: primero saturar con albúmina las paredes de vidrio y evitar con ello que la muestra se pegue a las paredes, y segundo calcular el volumen muerto de la columna. Todo el proceso se realiza en la cámara fría para evitar degradación de la hormona.

Con objeto de determinar el grado de pureza del glucagón- I^{125} y poder ver la fracción correspondiente a la hormona "buena" y la de la hormona degradada, se realiza una nueva cromatografía, esta vez en gel de Sephadex G-75 del pool de las fracciones obtenidas en G-25 en el 1^{er} pico (hormona mar

cada).

El método a seguir es exactamente igual al anteriormente descrito para el Sephadex G-25. (fig.15).

3.- Antisuero utilizado.

Se utilizó el antisuero 30 K, proporcionado por el Dr. Roger H. Unger (Facultad de Medicina de Dallas, Universidad de Tejas, E.E.U.U.). Este anticuerpo es muy específico para el Glucagón pancreático ó "verdadero", es decir, posee escasa actividad tanto hacia el Glucagón intestinal como hacia el GLI (Glucagón-like-Immunoreactivity).

III .d.a .2 .- Valoración de Glucagón.

Es necesario señalar que en el radioinmunoensayo del Glucagón se utiliza Trasylol para evitar la degradación del Glucagón- I^{125} por los enzimas presentes en el plasma durante el proceso de incubación según se expuso anteriormente (pag.140).

a) Preparación de la mezcla de incubación:

En cada tubo se pipetea:

- Glucagón- I^{125} : 15 pgr. (0,5 ml).
- Trasylol: 1000 U (0,1 ml).
- Muestra: plasma (0,2 ml).
- Antisuero 30 K a una dilución final de 1:40.000 (0,4 ml).

b) Preparación de la curva de calibración:

Simultáneamente se prepara una curva estándar representativa de este sistema. La curva estándar se preparó con una mezcla de Glucagón de cerdo y de buey, practicándose por triplicado cada punto de la curva, a partir de las siguientes concentraciones:

- 0,1 ml. GA (10 ug/ml) + 0,9 cc.sol.tampón..... 1.000 ng/ml.
- 0,1 ml. (1.000 ng/ml) + 0,9 cc.sol.tampón..... 100 ng/ml.
- 0,1 ml. (100 ng/ml) + 0,9 cc.sol.tampón 10 ng/ml.

En la curva estándar se utilizan los siguientes puntos:

- 0,5 ml. (10 ng/ml) + 2 cc.sol.tampón 2.000 pg/ml.
- 0,5 ml. (2.000 pg/ml) + 1,5 cc.sol.tampón..... 1.000 pg/ml.
- 1,0 ml. (1.000 pg/ml) + 1,0 cc.sol.tampón..... 500 pg/ml.
- 0,5 ml. (1.000 pg/ml) + 1,5 cc.sol.tampón..... 250 pg/ml.
- 0,5 ml. (1.000 pg/ml) + 0,9 cc.sol.tampón..... 100 pg/ml.
- 0,1 ml. (1.000 pg/ml) + 1,9 cc.sol.tampón..... 50 pg/ml.
- sol.tampón..... 0 pg/ml.

El tampón o buffer de análisis que se utiliza pra hacer las diluciones es: glicina 0,2 M con 0,25% de albúmina humana y 1% de suero de carnero (NSS) a un pH de 8,8.

Controles:

- Se hacen también por triplicado, se ponen las mismas proporciones ya descritas, pero sustituyendo el anticuerpo por solución tampón. Estos puntos sirven para ver el tanto por ciento de uniones inespecíficas.

- La incubación de estas muestras se realiza durante 4 días a 4°C. Tras este periodo se procede a la separación del Glucagón-I¹²⁵ libre, del Glucagón-I¹²⁵ unido al anticuerpo según el siguiente método.

c) Separación por carbón saturado con dextrano:

Esta técnica se basa en la facultad que tiene el carbón saturado con dextrano de absorber selectivamente la hormona radioactiva libre, quedando la unida al anticuerpo libre en el sobrenadante. (Dicha técnica descrita por Herbert y col. la hemos expuesto en III.σ.f.).

GLUCAGON - 125_{10} pg.
 ANTICUERPO: 30-K, 1:81.000
 MUESTRA: 0,2 ml
 ° ° CURVA REAL.
 □—□ CURVA TEORICA.

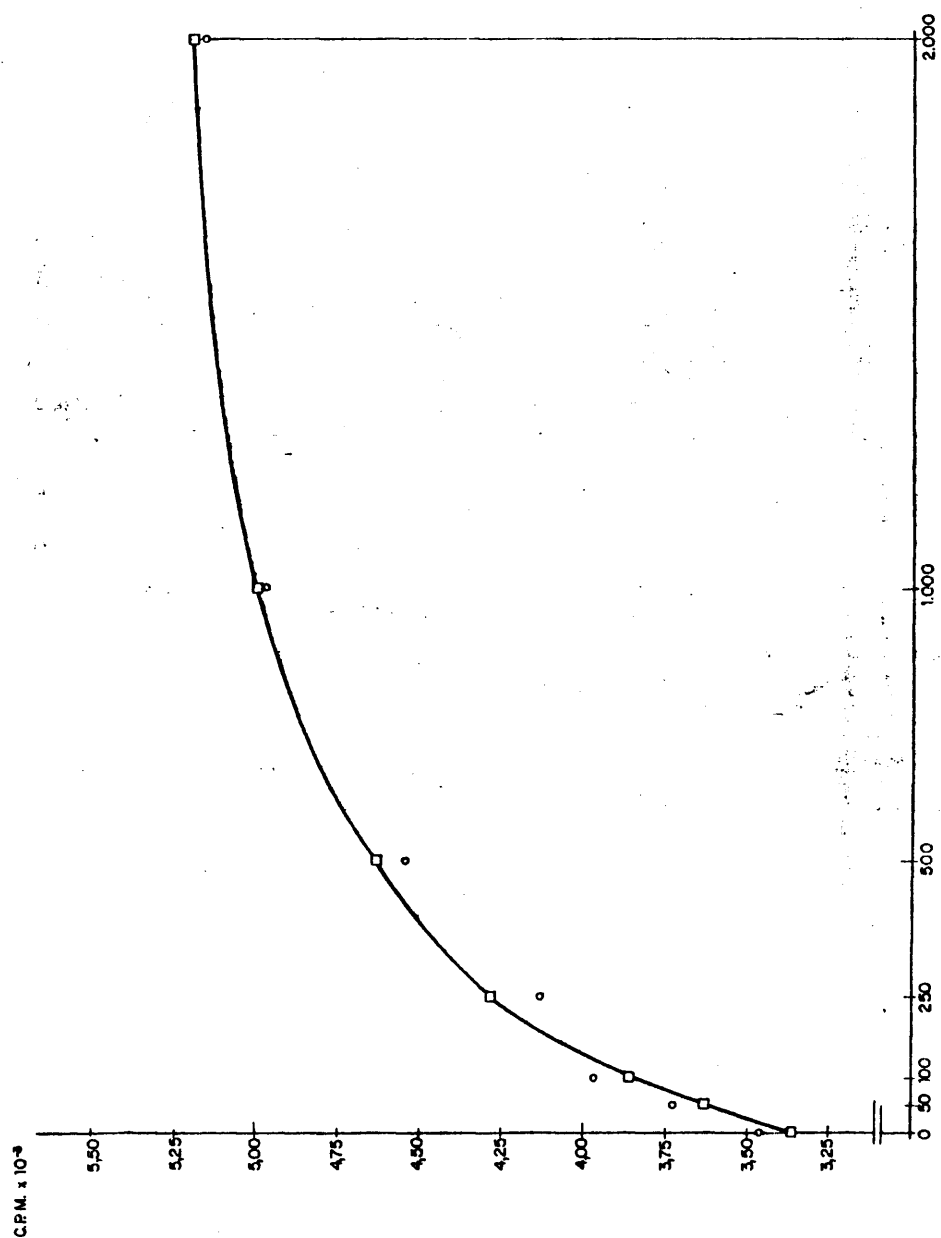


FIG. 18 - CURVA PATRON DE GLUCAGON

DETERMINACION DE HORMONA DE CRECIMIENTO

III. e. 3. Revisión de métodos.

Las primeras determinaciones de Hormona de Crecimiento (HGH), tanto del plasma como de la Hipófisis humana, fueron realizados por métodos biológicos.

Ahora bien la antigenicidad de los preparados de HGH purificada y la producción, en consecuencia, de un potente antisuero, abrieron las puertas de las técnicas inmunológicas.

Li y col. (1969) (124), propusieron una técnica basada en la precipitación que de forma cuantitativa tiene lugar entre la hormona (antígeno) y su anticuerpo específico, mejorada posteriormente por Greesspan y col. (1962) (125), que utilizan un anticuerpo anti-HGH, obtenido de conejos. El antisuero, previamente concentrado, se marca con ^{125}I y la radioactividad de la reacción de precipitación se determina con cierta facilidad.

Una gran mejora se ha conseguido con la introducción de técnicas radioinmunológicas empleando ^{131}I ó ^{125}I para marcar la hormona.

Molinetti y col. (1969), (126), realizan un estudio sobre los diversos métodos radioinmunológicos que se han propuesto para el estudio de la HGH y en él se plantea que la diferencia principal que entre ellos existe es respecto al procedimiento utilizado para separar la hormona libre del complejo antígeno-anticuerpo. De entre todos ellos hay un grupo de métodos que realizan esta separación por el procedimiento que se conoce como de doble anticuerpo, y es el

que con diferentes variaciones metodológicas se utiliza hoy día más extensamente. Consiste esencialmente en conseguir la precipitación del complejo anticuerpo-hormona marcada por un suero anti-gamma globulina y posterior separación por centrifugación ó mediante el procedimiento de membrana filtante.

Ya Pennisi en 1968, (127), nos describe un método para realizar el radioinmunoensayo de HGH, por el procedimiento antes descrito, en el que mediante la modificación de incubar el complejo hormona-anticuerpo a 37°C. se acorta el tiempo de reacción, que en los métodos en que se trabaja a 4°C. es de 4 a 5 días, hasta un mínimo de 6 horas, según había sido previamente estudiado por Herbert en 1965, (121), para el radioinmunoensayo de insulina y más recientemente por Catt (1967), (128), para la HGH. En 1969, el anteriormente citado Molinatti, realizó una serie de ensayos de HGH en normales y en pacientes acromegálicos con temperaturas de incubación de 4°C. y 37°C.. La fig.19 demuestra que los niveles obtenidos a 4°C., comparados con los que se obtienen a 37°C., presentan una dispersión de los valores teóricos claramente comprendidos dentro de los límites del error experimental.

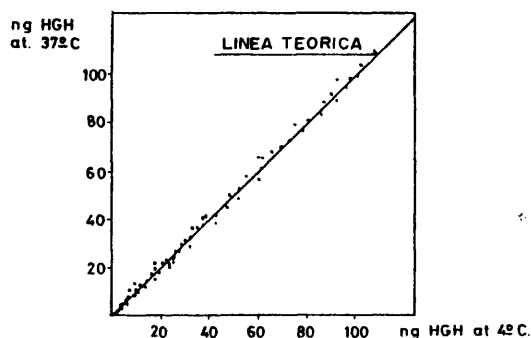


FIG. 19 - COMPARACION DE VALORES PLASMATICOS OBTENIDOS RESPECTIVAMENTE A 4° Y 37° C.

III.e.. 3. a. Método radioinmunológico

Nosotros hemos seguido en nuestro análisis de Hormona de Crecimiento en plasma de ratas en ayunas, el procedimiento arriba descrito del doble anticuerpo a la temperatura de 37°C., método que por los antecedentes bibliográficos y por la experiencia acumulada en el Departamento en que trabajamos, resulta el más idóneo para su determinación.

Utilizamos a tal fin el método estandarizado que nos proporcionó ONUBA, S.A. en cuyo Kit se incluye la hormona marcada con ^{125}I , la HGH estandar y el apropiado antisuero suministrado por la Asociación CEA-IRE-SORIN.

Contenido del Kit:

- Hormona de Crecimiento marcada con ^{125}I ; cada envase contiene la cantidad de HGH suficiente para 100 tubos. En el momento de su uso se disuelve su contenido con 10 ml. de agua bidestilada.
- Hormona de Crecimiento estandar, conteniendo 20 ng. de HGH liofilizada (preparación controlada por el Institute of Clinical Physiology, National Research Council, Pisa, Italia. Se reconstituye en el momento de utilizarla con 2 ml. de agua bidestilada. Resulta así una disolución de HGH a la concentración de 10 ng/ml..
- Anticuerpo de HGH. El anticuerpo anti-HGH, se ha obtenido de cerdo según el procedimiento descrito por Molinatti y Massara (126). El anticuerpo utilizado por nuestro experimento está a una dilución final de 1: 160.000.
- Antisuero precipitante; al igual que el anterior obtenido por el procedimiento indicado por los dos auto

res que acabamos de mencionar. Se reconstituye el vial con 10 ml. de agua bidestilada en el momento de usarlo, quedando a una dilución final de 1: 32.

- Buffer borato 0,13 M., pH= 8,4 (como buffer de análisis), que contiene 0,5 % de albúmina bovina (BSA).
- Albúmina sérica humana (HGH), utilizada para la incubación del complejo hormona-anticuerpo. Se disuelve el contenido del vial con 10 ml. de agua bidestilada.

Como precaución a tener en cuenta en el desarrollo del análisis radioinmunológico es la de utilizar tubos de plástico durante todo el ensayo, pues debido al hecho de que la HGH es adsorbida por la superficie del cristal de los tubos de este material, haría necesario, en caso de utilizarlos, tratarlos con una emulsión al 2 % de silicona en agua destilada y secarlos a 180°C. durante 4 a 5 horas.

Preparación de la curva estandar:

El estandar de 2 ng. de HGH liofilizado se reconstituye con 2 ml. de agua bidestilada, siendo su concentración final en disolución de 10 ng/ml., a partir de la cual, y con el buffer de análisis (borato), se hacen las siguientes diluciones:

- 1 ml. de sol. de 10 ng/ml. 10 ng/ml.
- 1 ml. de sol. de 10 ng/ml.+ 1 ml. buffer. 5 ng/ml.
- 1 ml. de sol. de 5 ng/ml. + 1 ml. buffer. 2,5 ng/ml.
- 1 ml. de sol. de 2,5 ng/ml. + 1 ml. buffer 1,25 ng/ml
- 1 ml. de sol. de 1,25 ng/ml.+ 1,5 ml. buffer 0,50 ng/ml
- buffer 0 ng/ml.

Tods los tubos de la curva de calibración se preparan por duplicado, según el siguiente protocolo:

- 0,1 ml. estandar
- 0,1 ml. AK
- 0,1 ml. de HSA
-
- 0,3 ml.

La adición de la sol. de HSA a todos los tubos tiene como finalidad minimizar las variaciones de nivel proteico entre la muestras problema y los estandar de calibración.

Preparación de las muestras:

Las muestras de plasma a nalizar se preparan de la siguiente manera:

- 0,1 ml. muestra
- 0,1 ml. AK
- 0,1 ml. de HSA
-
- 0,3 ml

Igualmente todas las pruebas se determinan por separado.

Además se preparan las pruebas llamadas de actividad total, que al no llevar anticuerpo permiten conocer la cantidad de HGH añadida a cada prueba.

Procedimiento a seguir:

- Se mezcla el contenido de los tubos y se incuban a 37° C. durante 6 horas.
- Se pipetea dentro de todos los tubos 0,1 ml. de Hormo na marcada (HGH-¹²⁵I). Se mezclan bien los tubos y se incuban a 37°C. durante 18 horas.
- Pipetear en todos los tubos (excepto en los de activi

dad total) 0.1 ml. del antisuero precipitante en solución. Mezclar el contenido de cada tubo e incubar a 37°C. durante una hora.

Separación de la hormona libre de la ligada al antisuero:

Nosotros hemos realizado para ello el procedimiento de separar el precipitado por centrifugación , a tal fin se centrifugan todos los tubos (excepto los de actividad total) a 1500- 2000 rpm, durante 10 min. a temperatura ambiente.

A continuación se decanta cuidadosamente el sobrenadante, se añade a todos los tubos (excepto a los de actividad total) 0,5 ml. de buffer borato.

Se centrifugan nuevamente todos los tubos (excepto los de actividad total), a 1500- 2000 rpm, durante 10 min. a temperatura ambiente.

Decantamos nuevamente el sobrenadante y se mide la radiactividad de todos los tubos.

C.P.M.

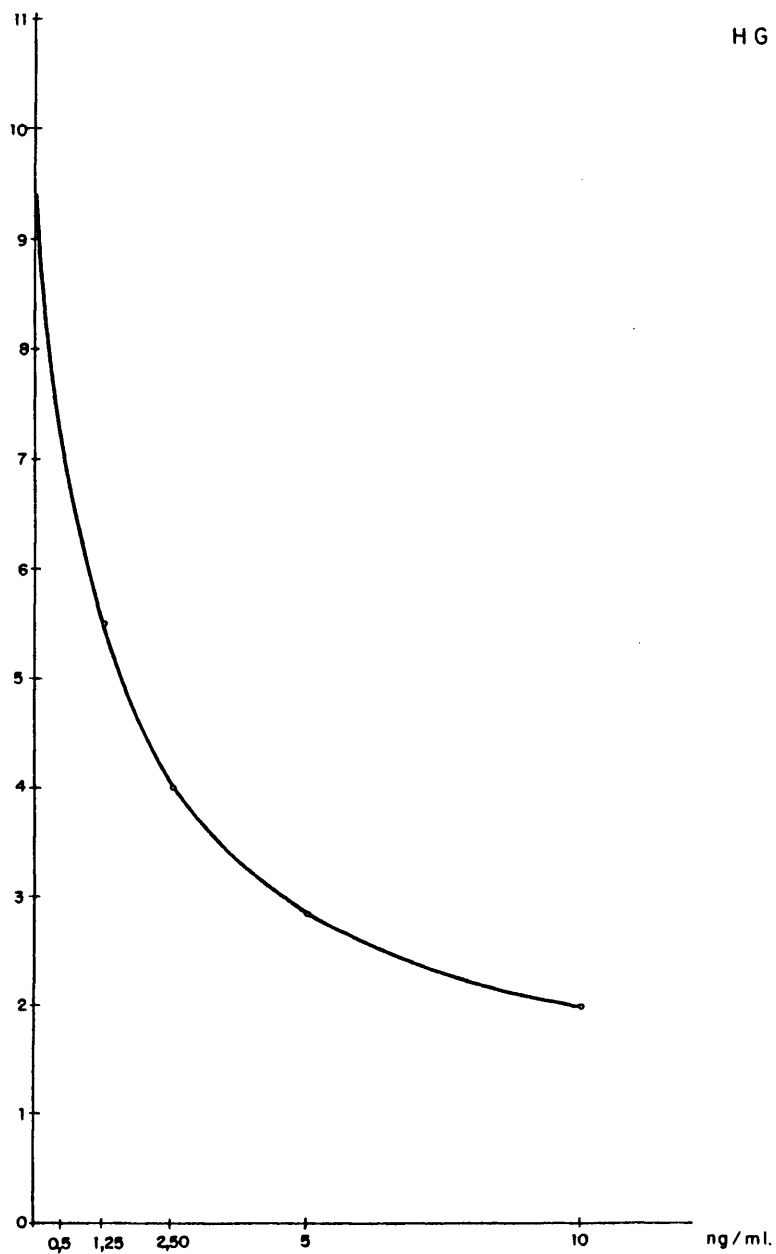


FIG. 20 -CURVA ESTANDAR AJUSTADA DE HGH - LOS CIRCULOS CORRESPONDEN A LOS VALORES EXPERIMENTALES.

IV.- RESULTADOS

IV. a.- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA CORRELACION
ENTRE TIEMPO DE AYUNO Y PESO.

Una vez seleccionada la función hiperbólica como la que mejor describe el proceso de la pérdida de peso en el ayuno (cap.II.b), hemos detallado en la fig. 21 los pesos teóricos deducidos por este ajuste, en las ratas sometidas a nuestro proceso experimental, tomados del cuadro nº 5 en el que se han dispuesto los valores medios de los pesos de las 50 ratas a lo largo de los siete días de ayuno.

La fig. 21 , como se ha indicado anteriormente, representa gráficamente los pesos de cada día obtenidos por este ajuste y no permite afirmar, tal como habíamos dejado indicado en el cap. II, que la pérdida de peso en el ayuno, responde a una ley numérica en función del tiempo, con lo que se elimina el azar de tal proceso biológico en individuos normales.

Pero no ha sido ésta la única pregunta que nos hemos planteado al desarrollar nuestro experimento, sino que hemos querido conocer si la pérdida de peso está condicionada al tiempo de ayuno, esto es, si seguirá produciéndose al prolongarse el tiempo ó bien si por el contrario se tiende a un valor constante de peso por el individuo sometido a él.

Ya "per se", al aplicar la función hiperbólica a este proceso se describe una trayectoria que tiende a un valor asintótico constante en el tiempo, el cual, conocido como asíntota de la hipérbola, nos da cuantía del valor mínimo que podría llegar a alcanzar el peso cuando el tiempo de ayuno se prolongase indefinidamente (parte $t \rightarrow \infty$).

	0	1	2	3	4	5	6	7
1	265,6	240,7	228,7	215,5				181,96
2	262,1	245,0	232,3	219,0	207,9	198,2	197,4	188,1
3	279,2	257,0	244,5	231,0	219,9	208,7	207,9	194,8
4	279,4	257,92	244,65	236,8				194,4
5	284,3		263,2					
6	291,0		269,0	255,15	247,7	237,0	226,4	213,8
7	291,2		268,4	257,9	249,5	239,1	230,0	221,1
8	299,0		261,5		232,0		213,7	
9	299,6	287,9	275,0	259,1	245,9	235,0	233,1	223,3
10	311,0					245,5		
11	302,6		273,78					
12	306,4	290,0	277,1	265,0		251,90		
13	310,0		285,2					
14	309,2	297,2	282,0	274,0		262,30		
15	310,8		285,2	274,7	271,9	269,40	257,61	251,4
16	311,0	295,4	281,0	271,30		253,40		
17	318,7	304,0	285,6	274,3	266,1	254,8	248,2	239,4
18	323,6		296,0					
19	325,1	306,0	288,0	268,6	263,2	257,7	252,5	245,1
20	330,6		310,2					
21	340,5	321,45	302,9	288,2	279,5	272,1	267,3	260,7
22	341,4	322,85	306,15	294,0	269,61			
23	344,9	328,4	310,9	294,8	282,7	270,6	273,7	265,1
24	349,0	331,2	310,7	296,5	286,4	274,8	273,2	266,3
25	359,5	336,4		311,0				
26	362,0			329,0		310,0		
27	364,2	340,8	321,4	309,7	305,9	301,8	292,2	276,5
28	365,5	344,4	326,1	310,2	309,4	304,1	293,6	279,7
29	369,5			306,0		285,0		266,0
30	372,2	352,0	337,4	321,3	316,9	308,7	303,9	293,0
31	373,5	350,8		326,35				
32	375,5		338,7	323,5				
33	378,0	355,9	332,3	326,2	319,7	314,2	306,9	291,8
34	380,1	346,15	337,7					
35	382,1	347,0	334,7					
36	386,0			312,0		291,0		271,5
37	389,2	367,2	351,0	331,7	329,0	320,4	315,3	299,7
38	392,5	366,8	343,2					
39	398,8	378,7		343,1				
40	411,0		387,1					
41	431,0		368,5			343,0		330,0
42	434,0				366,0			339,0
43	434,0		389,0			351,0		331,0
44	456,0	425,8	417,0	400,0	387,0	384,4	374,9	374,9
45	449,8	423,0	405,7	386,5	379,7	378,7	370,7	367,7
46	453,8	412,7	405,8	379,1	367,5	356,4	346,6	345,8
47	463,5		424,6		410,2	394,1		
48	468,2	444,0	427,3	406,1	395,0	388,0	378,1	376,7
49	493,0	466,0	457,1	438,3	420,8	420,7	406,5	407,2
50	513,0	489,0	469,0	449,9	438,5	432,85	424,0	421,4
n	50	31	42	36	26	31	23	29
\bar{X}	360,64	342,64	322,75	311,00	309,30	297,48	291,35	283,36
DS	63,08	62,24	61,68	59,55	64,94	60,16	66,00	66,54
ES	8,92	11,18	9,52	9,93	12,74	10,80	13,76	12,36

157

TABLA Nº 1 - PESOS EXPERIMENTALES DE LAS 50 RATAS UTILIZADAS EN NUESTRO TRABAJO, SE DETALLAN LOS PESOS OBTENIDOS EN CADA DÍA DE AYUNO, INCLUYENDO EL PESO

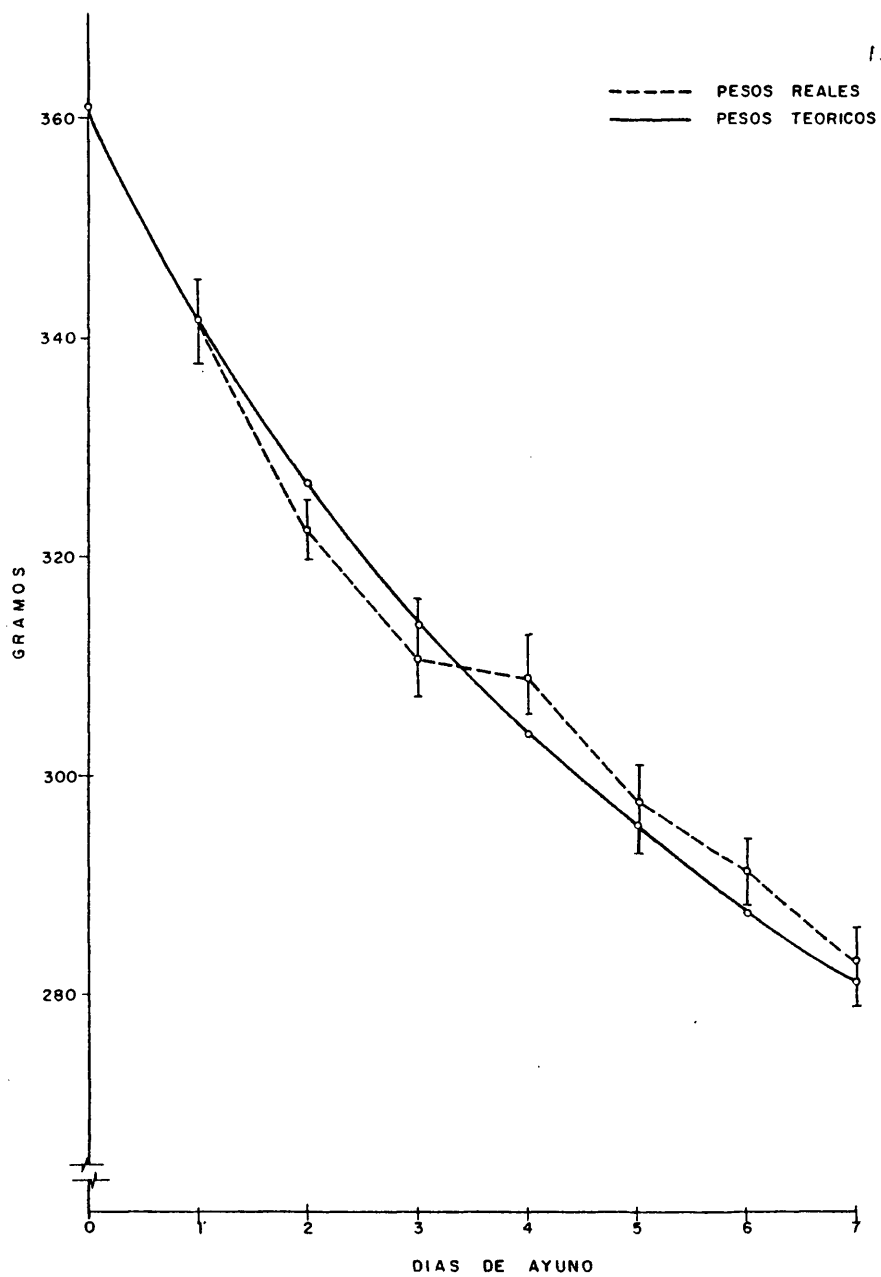


FIG.21 - EVOLUCION DE LA PERDIDA DE PESO MEDIANTE UN AJUSTE HIPERBOLICO, SE COMPARA CON LOS VALORES MEDIOS DE LOS PESOS REALES DE LOS SIETE DIAS DE AYUNO.

IV. b. INFLUENCIA DEL PESO INICIAL EN EL COMPORTAMIENTO DE PÉRDIDA DE PESO CORPORAL.

Antes de comenzar el estudio de este capítulo, es digno de destacar el comportamiento de la pérdida de peso que experimentan diariamente los animales sometidos a nuestra observación.

Resumimos para ello a continuación la pérdida diaria, expresada en gramos, en la que hemos obtenido los siguientes valores:

tiempo (t)	1	2	3	4	5	6	7
gramos	18,00	19,89	11,75	1,70	11,82	6,13	7,99

que se pueden representar en una gráfica (gráfica nº 13), a fin de una mejor observación.

Destacamos el hecho de gran interés, de que en el día 4 del ayuno, se produce un valor mínimo en la pérdida de peso, siendo su valor absoluto de 1,70 gr. muy alejado de las pérdidas de los días restantes.

IV. b. 1. Clasificación y estudio.

En el capítulo II hemos expuesto una de las causas que motivan el presente trabajo; llegar a conocer en qué manera el peso inicial al comienzo del ayuno, influye en la evolución de la pérdida de peso. Y para ello según se expresó en el capítulo III se han clasificado a las ratas en cuatro grupos atendiendo a su peso inicial. Esta clasificación aún cuando es arbitraria delimita perfectamente las diferencias de peso de uno a otro grupo.

Estadísticamente lo podemos comprobar calculando la t de Student entre los grupos y así observamos que efectivamente (cuadro n° 12) hay una diferencia significativa entre los cuatro grupos.

CUADRO N° 12

	1ª G.	2ª G.	3ª G.	4ª G.
1ª G.		g.L = 23 6,42	g.L = 23 17,38	g.L = 10 16,83
2ª G.	g.L = 23 6,42		g.L = 29 11,27	g.L = 25 15,78
3ª G.	g.L = 23 17,38	g.L = 29 11,27		g.L = 25 9,97
4ª G.	g.L = 19 16,83	g.L = 25 15,78	g.L = 25 9,97	

En el tratamiento clínico de la obesidad, hay autores J.A. Innes (90), que clasifican a sus enfermos de acuerdo con un ex

ceso de su peso ideal en el comienzo del tratamiento.

Todo ello nos habla en favor de que uno de los caminos a seguir para investigar la influencia del peso inicial, es clasificar los sujetos que se han de someter al ayuno, para después poder comparar su evolución dentro de cada grupo y en tre grupos distintos.

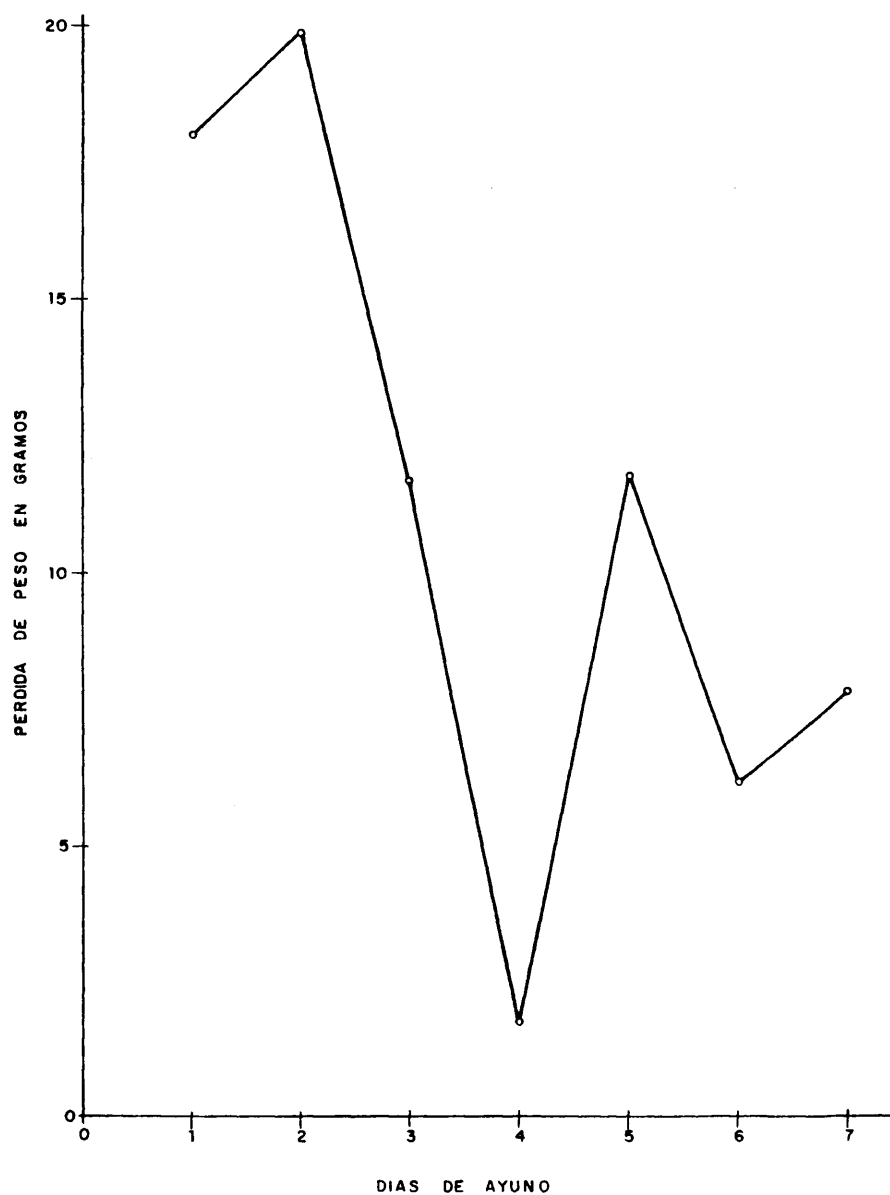


FIG. Nº22 - PERDIDA DIARIA EN GRAMOS EXPERIMENTADA POR LAS 50 RATAS; LOS PUNTOS REPRESENTAN LAS MEDIAS ARITMETICAS EN CADA DIA.

IV .b .2.- Tratamiento estadístico con pesos reales en los cuatro grupos.

Ordenando en forma de un cuadro comparativo, hemos dispuesto en columna los pesos medios obtenidos en cada día de ayuno en los cuatro grupos que nos han resultado de la clasificación anteriormente expuesta.

En este cuadro se disponen, de la misma forma el número de observaciones y las desviaciones estandar de cada una de ellas (cuadro n° 13).

Practicamos el tratamiento estadístico con los datos así representados comenzando por desarrollar el ajuste entre tiempos y las medias aritméticas de los valores de los pesos hallados en nuestra experiencia para cada grupo.

Fijando más nuestra atención en el primer grupo, comprobamos que la media aritmética de los pesos experimentales es en el día del comienzo del ayuno de $282,26 \pm 14,6$ gramos.

Este peso es el que se considera como peso óptimo alcanzado en una rata de edad somática adulta y por tanto podemos pues tomarlo como peso de referencia, en el cual no existe un exceso de peso de acuerdo con nuestra experiencia.

El ajuste mediante la función hiperbólica estudiada en III. a. 4. se aplica ahora a los pesos medios clasificados en grupos obteniendo los siguientes valores en las correlaciones efectuadas por este método.

C U A D R O N° 13

1 ^{er} grupo (n)	D.S.	2 ^o grupo	(n)	D.S.	3 ^{er} grupo	(n)	D.S.	4 ^o grupo	(n)	D.S.		
Peso m. (n)	D.S.	Peso m. (n)	D.S.	P. medio	(n)	D.S.	P. medio	(n)	D.S.			
0	282,26	9	14,60	322,26	15	14,88	376,57	15	11,26	455,21	11	27,76
1	257,70	5	16,51	310,72	9	14,56	352,39	11	11,56	443,42	6	26,64
2	254,14	9	15,99	292,48	14	12,80	338,05	9	10,98	415,11	10	29,54
3	239,21	7	17,08	280,14	10	11,32	320,84	12	10,72	410,01	7	23,95
4	233,82	6	15,56	274,06	7	7,92	316,18,	5	8,11	387,46	8	27,45
5	223,60	5	16,83	262,47	10	9,53	304,40	8	10,98	386,33	8	30,17
6	218,05	6	12,88	262,08	6		302,38	5	8,61	384,70	6	24,68
7	202,49	7	15,40	254,67	6	10,13	282,60	7	11,52	364,97	9	30,73

Pesos reales de los cuatro grupos con el n° de casos (n) y la desviación estándar (D.S.) en cada grupo.

En el cuadro nº14 se detalla el coeficiente de correlación "r" y los parámetros de la hipérbola "a" y "b" que resultan de aplicar el ajuste detallado en III. a. 4. a cada uno de los cuatro grupos que hemos realizado con los pesos de las ratas según el criterio expuesto en el cuadro nº 14.

CUADRO Nº 14.

	1 ^{er} grupo	2 ^a grupo	3 ^{er} grupo	4 ^a grupo
r	0,98299579	0,99498211	0,99701458	0,9551538
a	0,03038785	0,05188415	0,03409068	0,0383527
b	0,01102493	0,00726034	0,00760565	0,0067519

TABLA N° 3

	0	1	2	3	4	5	6	7
1	255,60	240,70	228,70	215,50	—	—	—	181,95
2	261,10	245,00	232,30	219,00	207,90	198,20	197,20	188,10
3	279,20	257,00	244,50	231,00	219,90	208,70	207,90	194,80
4	279,40	257,92	244,65	236,80	—	—	—	194,40
5	284,30	—	263,20	—	—	—	—	—
6	291,00	—	269,00	255,15	247,70	237,00	226,40	213,80
7	291,20	—	268,40	257,90	249,50	239,10	230,00	221,10
8	299,00	—	261,50	—	232,00	—	213,70	—
9	299,60	287,90	275,00	259,10	245,90	235,00	233,10	223,30
n	9	5	9	7	6	5	6	7
\bar{X}	282,26	257,70	254,14	239,21	233,82	223,60	218,05	202,49
D.S.	14,60	16,51	15,99	17,08	15,56	16,83	12,88	15,40
E.S.	4,87	7,38	5,33	6,46	6,35	7,53	5,26	5,82

· PESOS REALES DE LAS RATAS DEL 1er GRUPO

TABLA N° 4

	0	1	2	3	4	5	6	7
1	311,00	—	—	—	—	245,50	—	—
2	311,00	295,40	281,00	271,30	—	253,40	—	—
3	310,00	—	285,20	—	—	—	—	—
4	309,20	297,20	282,00	274,00	—	262,30	—	—
5	302,60	—	273,78	—	—	—	—	—
6	341,40	322,85	306,15	294,00	269,61	—	—	—
7	323,60	—	296,00	—	—	—	—	—
8	306,40	290,00	277,10	265,00	—	251,90	—	—
9	330,60	—	310,20	—	—	—	—	—
10	310,80	—	285,20	274,70	271,90	269,40	257,61	251,40
11	349,00	331,20	310,70	296,50	285,40	274,80	273,20	266,30
12	344,00	328,40	310,90	294,80	282,70	273,70	270,60	265,10
13	340,50	321,45	302,90	288,20	279,50	272,10	267,30	260,70
14	318,70	304,00	285,60	274,30	266,10	254,80	248,20	239,40
15	325,10	306,00	288,00	268,60	263,20	257,70	252,50	245,10
n	15	9	14	10	7	10	6	6
\bar{X}	322,26	310,72	292,48	280,14	274,06	261,25	262,08	254,67
D.S.	14,88	14,56	12,80	11,32	7,92	9,53	9,919	10,13
E.S.	3,84	4,85	3,42	3,58	2,99	3,01	4,05	4,14

· PESOS REALES DE LAS RATAS DEL 2º GRUPO

TABLA N° 5

	0	1	2	3	4	5	6	7
1	386,00	—	—	312,00	—	291,00	—	271,50
2	380,10	346,15	337,70	—	—	—	—	—
3	369,50	—	—	306,00	—	285,00	—	266,00
4	382,10	347,00	334,70	—	—	—	—	—
5	362,00	—	—	329,00	—	310,00	—	—
6	359,50	336,40	—	311,00	—	—	—	—
7	378,00	355,90	332,30	326,20	319,70	314,20	306,90	291,80
8	373,50	350,80	—	326,35	—	—	—	—
9	398,80	378,70	—	343,10	—	—	—	—
10	392,50	356,80	343,20	—	—	—	—	—
11	375,50	—	348,70	323,50	—	—	—	—
12	372,20	352,00	337,40	321,30	316,90	308,70	303,90	293,00
13	389,20	367,30	351,00	331,70	329,00	320,40	315,30	299,70
14	365,50	344,40	326,10	310,20	309,40	304,10	293,60	279,70
15	364,20	340,80	321,40	309,70	305,90	301,80	292,20	276,50
n	15	11	9	12	9	8	5	7
\bar{x}	376,57	352,39	338,05	320,84	316,18	304,40	302,38	282,60
D.S.	11,26	11,56	10,98	10,72	8,11	10,98	8,61	11,52
E.S.	2,91	3,49	3,66	3,09	3,63	3,88	3,85	4,35

· PESOS EXPERIMENTALES DEL 3º GRUPO ·

TABLA N° 6

	0	1	2	3	4	5	6	7
1	431,00	—	368,50	—	—	343,00	—	330,00
2	434,00	—	—	—	366,00	—	—	339,00
3	434,00	—	389,00	—	—	351,00	—	331,00
4	456,00	425,80	417,00	400,00	387,10	384,40	374,90	374,90
5	453,80	412,70	405,80	379,10	367,50	356,40	346,60	345,80
6	468,20	444,00	427,30	406,10	395,00	388,00	378,10	377,70
7	449,80	423,00	405,70	386,50	379,70	378,70	370,70	367,70
8	493,00	466,00	457,10	438,30	420,80	420,90	407,20	406,50
9	513,00	489,00	469,00	449,90	438,50	432,85	424,00	421,40
10	411,00	—	387,10	—	—	—	—	—
11	463,50	—	424,60	410,20	354,10	—	—	—
n	11	6	10	7	8	8	6	9
\bar{X}	455,21	443,42	415,11	410,01	387,46	386,32	384,70	364,97
DS	27,76	26,64	29,54	23,95	27,45	30,17	24,68	30,73
ES	8,37	10,88	9,34	9,05	10,38	10,67	10,08	10,24

· PESOS EXPERIMENTALES DEL 4º GRUPO ·

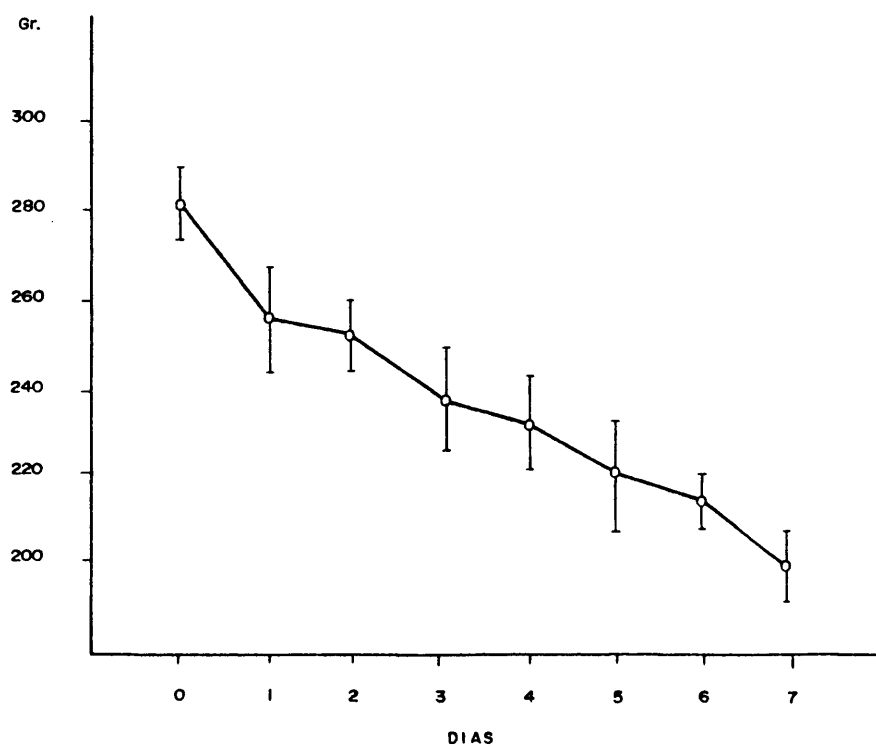


FIGURA n° 23.- PERDIDA DE PESO EN VALORES REALES A LO LARGO DEL AYUNO EN EL 1º GRUPO

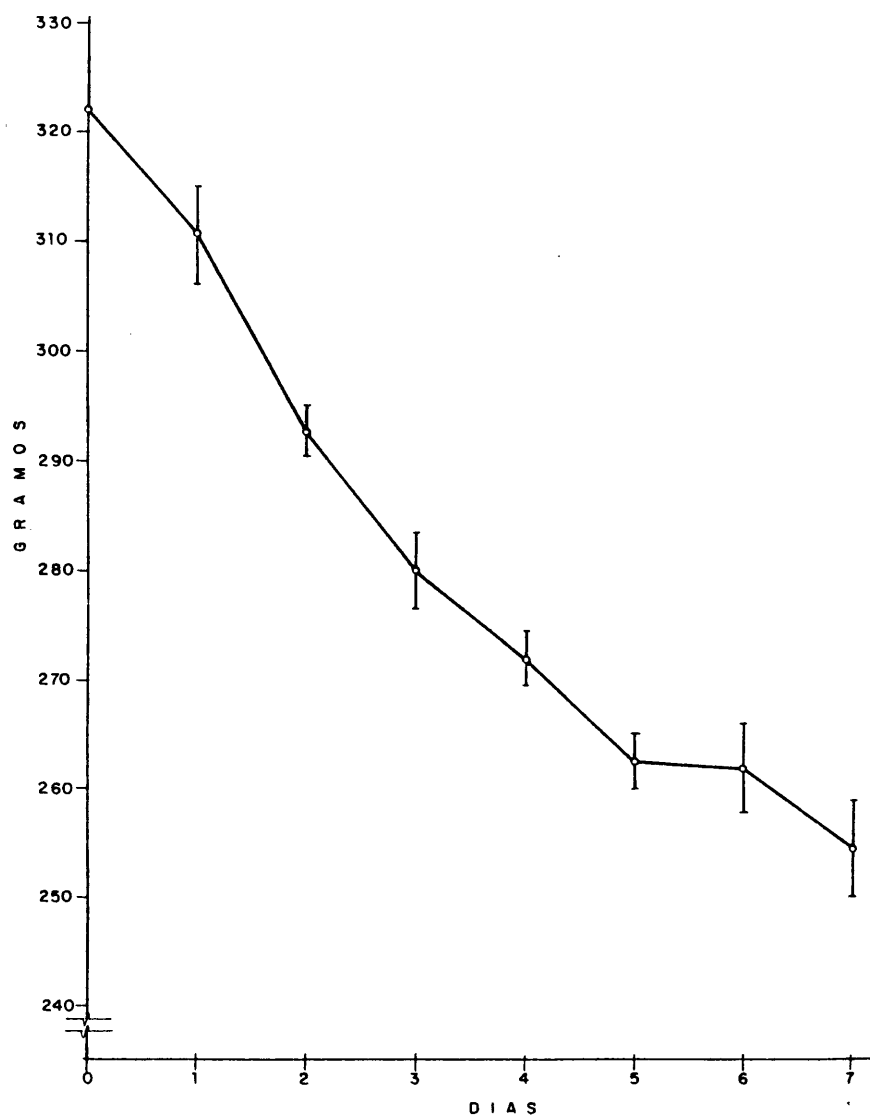


FIG. N° 24 - PESOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS CON LAS RATAS DEL 2º GRUPO EN LOS 7 DIAS DE AYUNO.

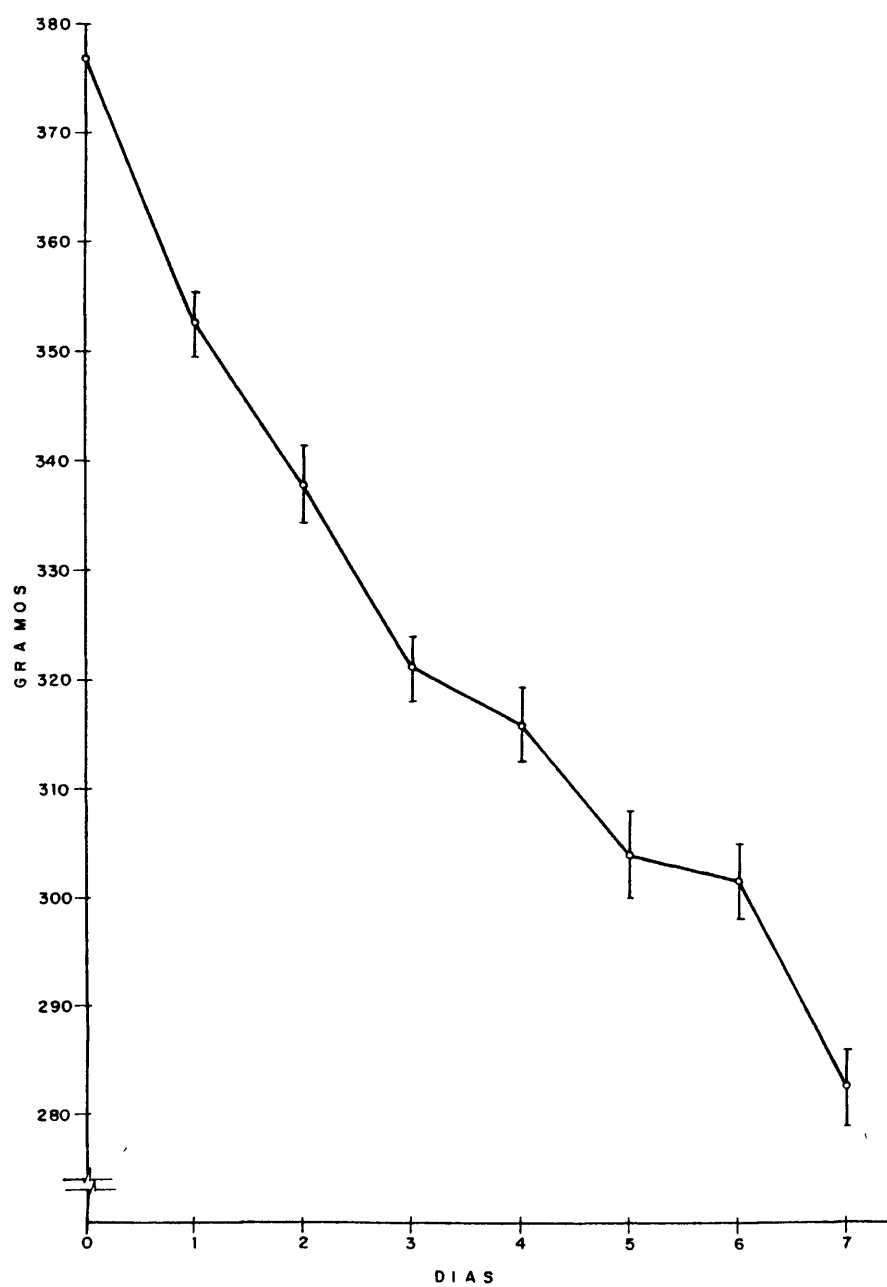


FIG. Nº 25 - PESOS EXPERIMENTALES DE LAS RATAS DEL 3º GRUPO A LO LARGO DEL AYUNO.

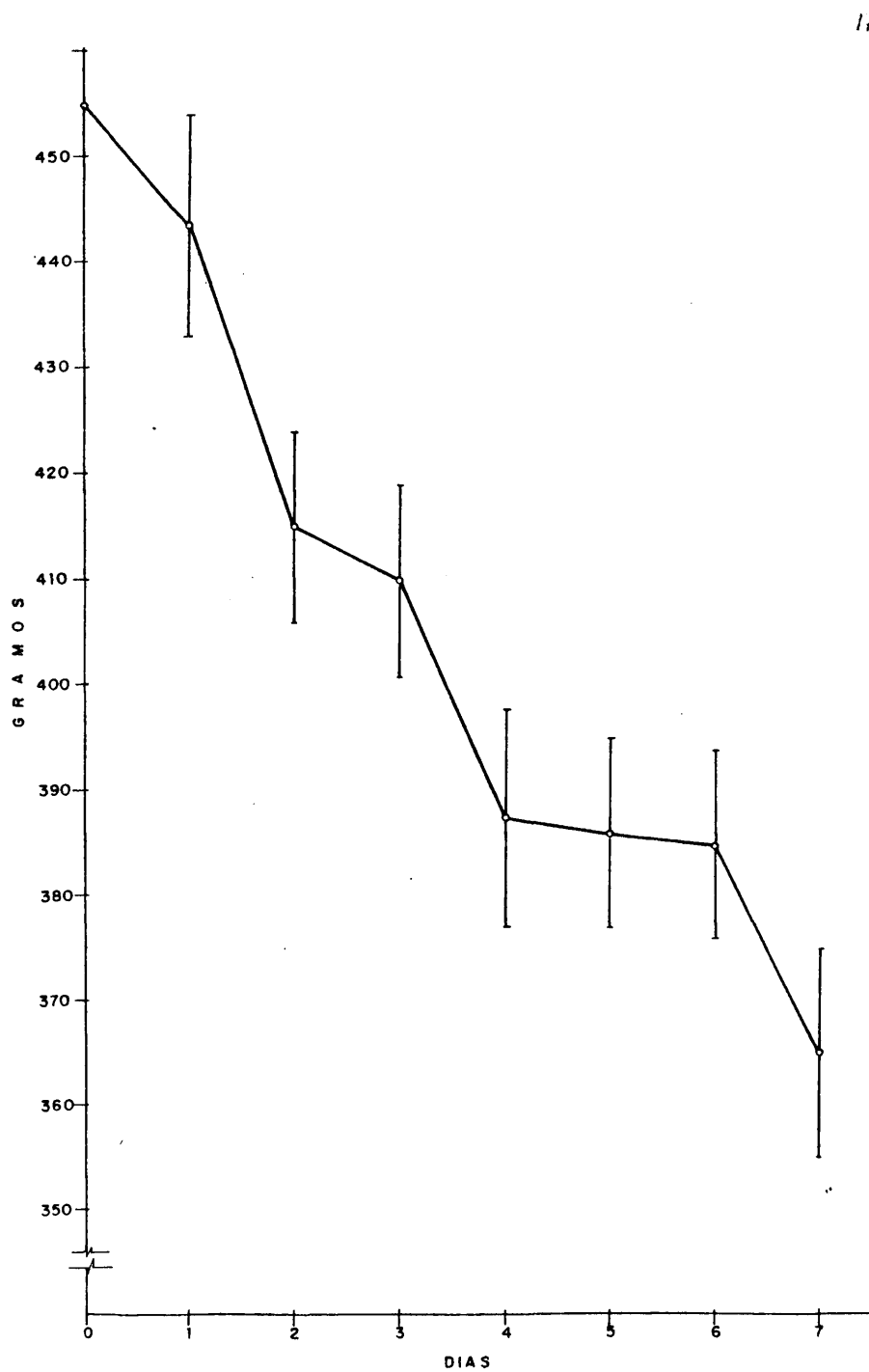


FIG. Nº 26 - PESOS EXPERIMENTALES DEL 4º GRUPO A LO LARGO DEL AYUNO CON LA DESVIACION MEDIA EN CADA DIA.

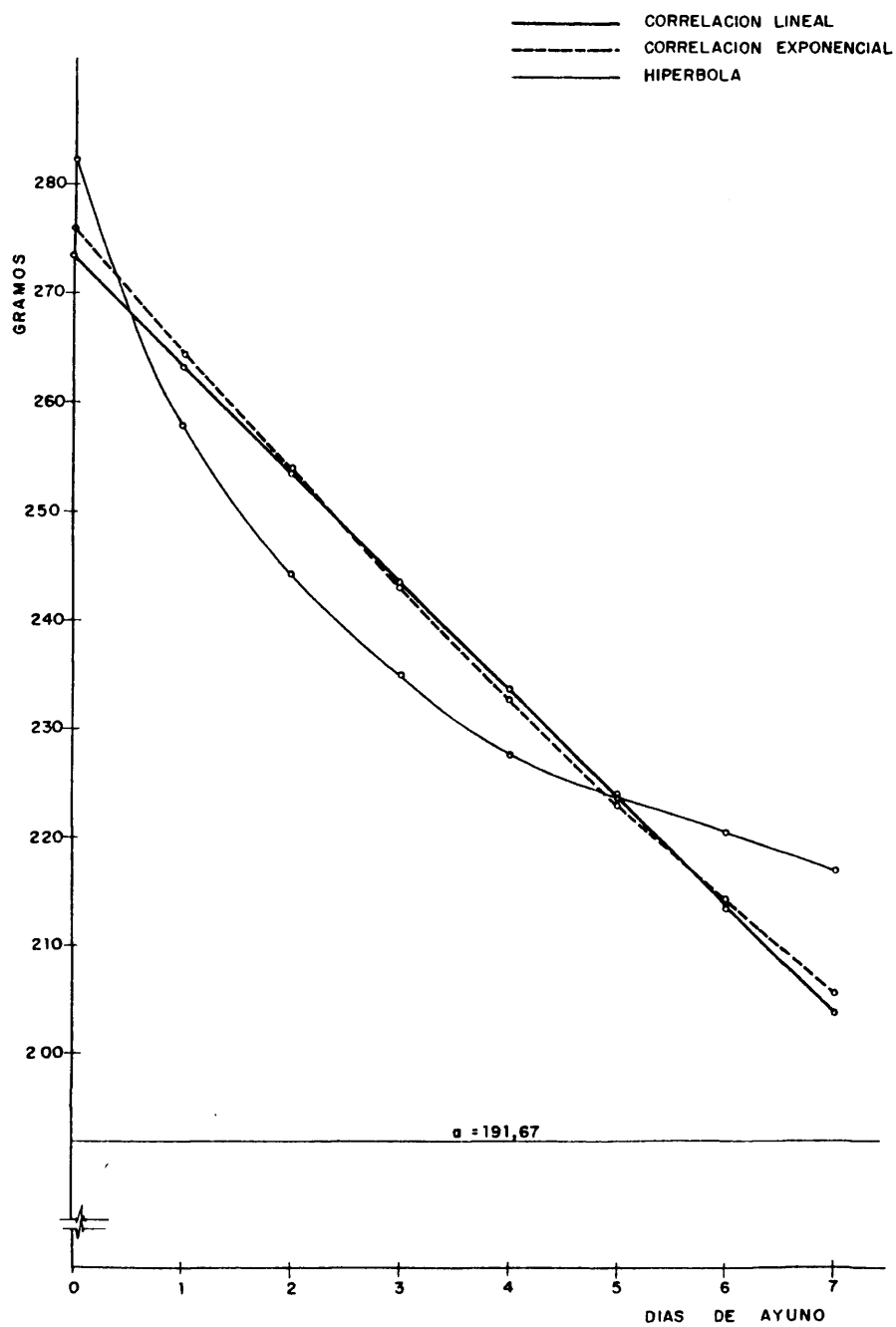


FIG. N° 27 - GRAFICA QUE NOS MUESTRA COMPARATIVAMENTE LOS TRES AJUSTES EN EL 1º GRUPO.

175

— CORRELACION LINEAL
 - - - CORRELACION EXPONENCIAL
 — HIPERBOLA

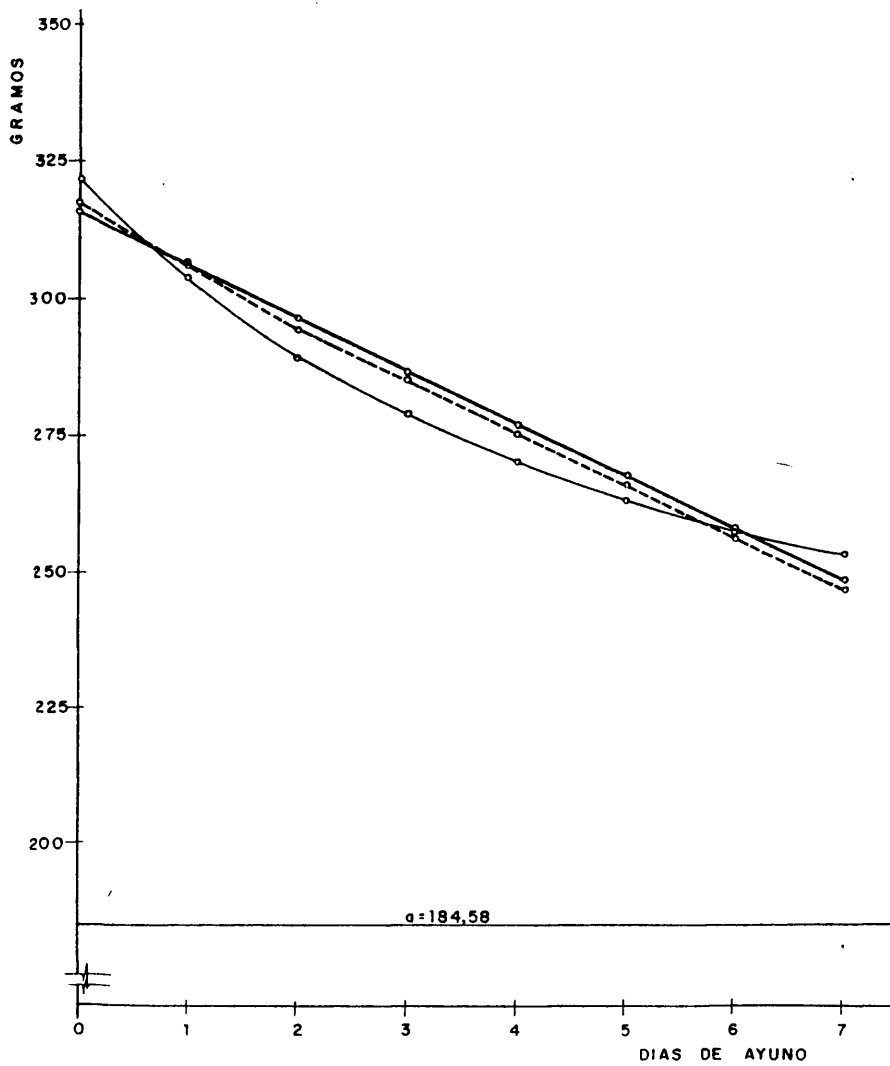


FIG. Nº 28 - GRAFICA QUE NOS COMPARA LOS TRES AJUSTES REALIZADOS EN LOS PESOS DEL 2º GRUPO DE RATAS

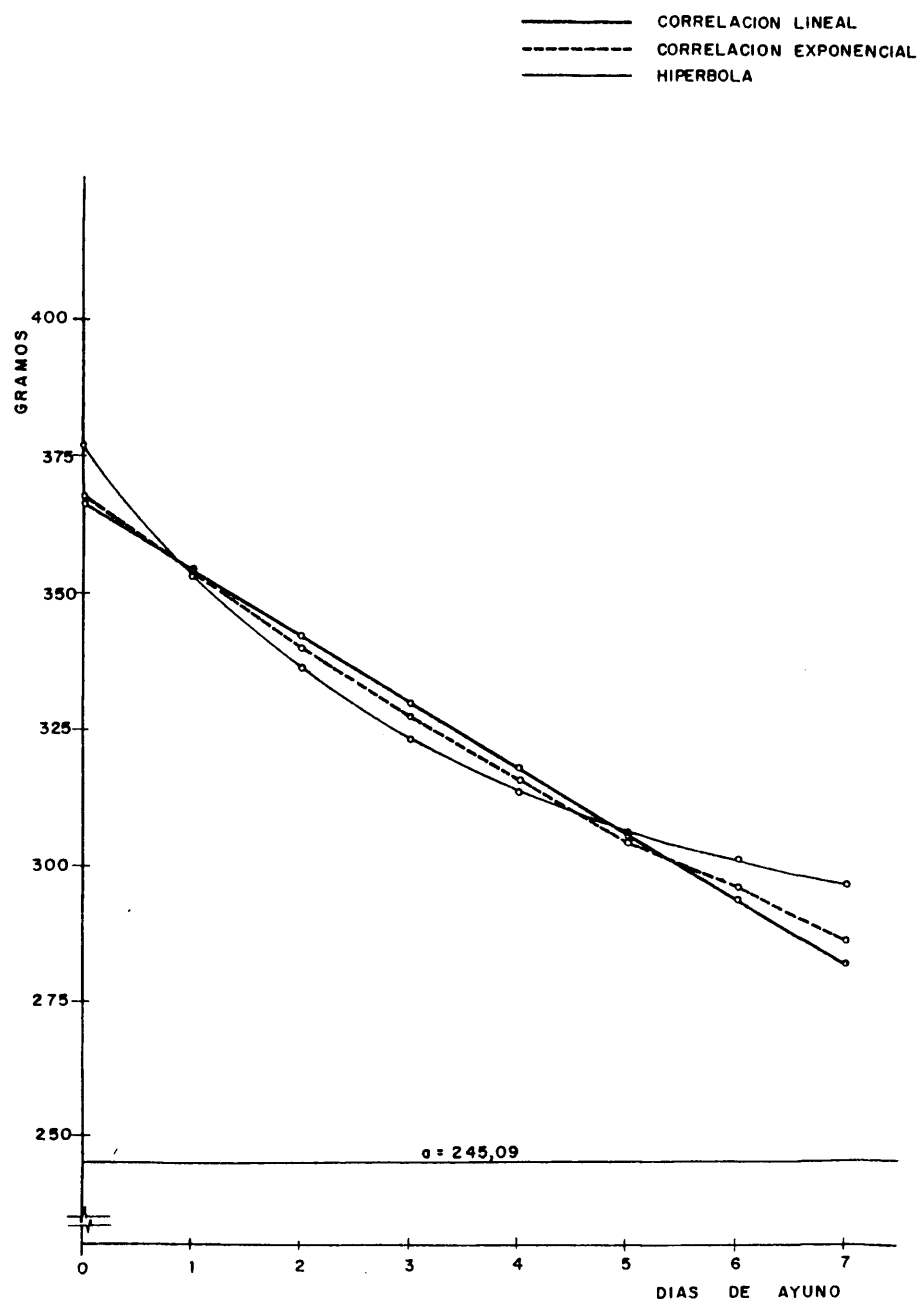


FIG. Nº 29 - COMPARACION DE LOS TRES AJUSTES REALIZADOS CON LOS PESOS EXPERIMENTALES DE LAS RATAS DEL 3º GRUPO.

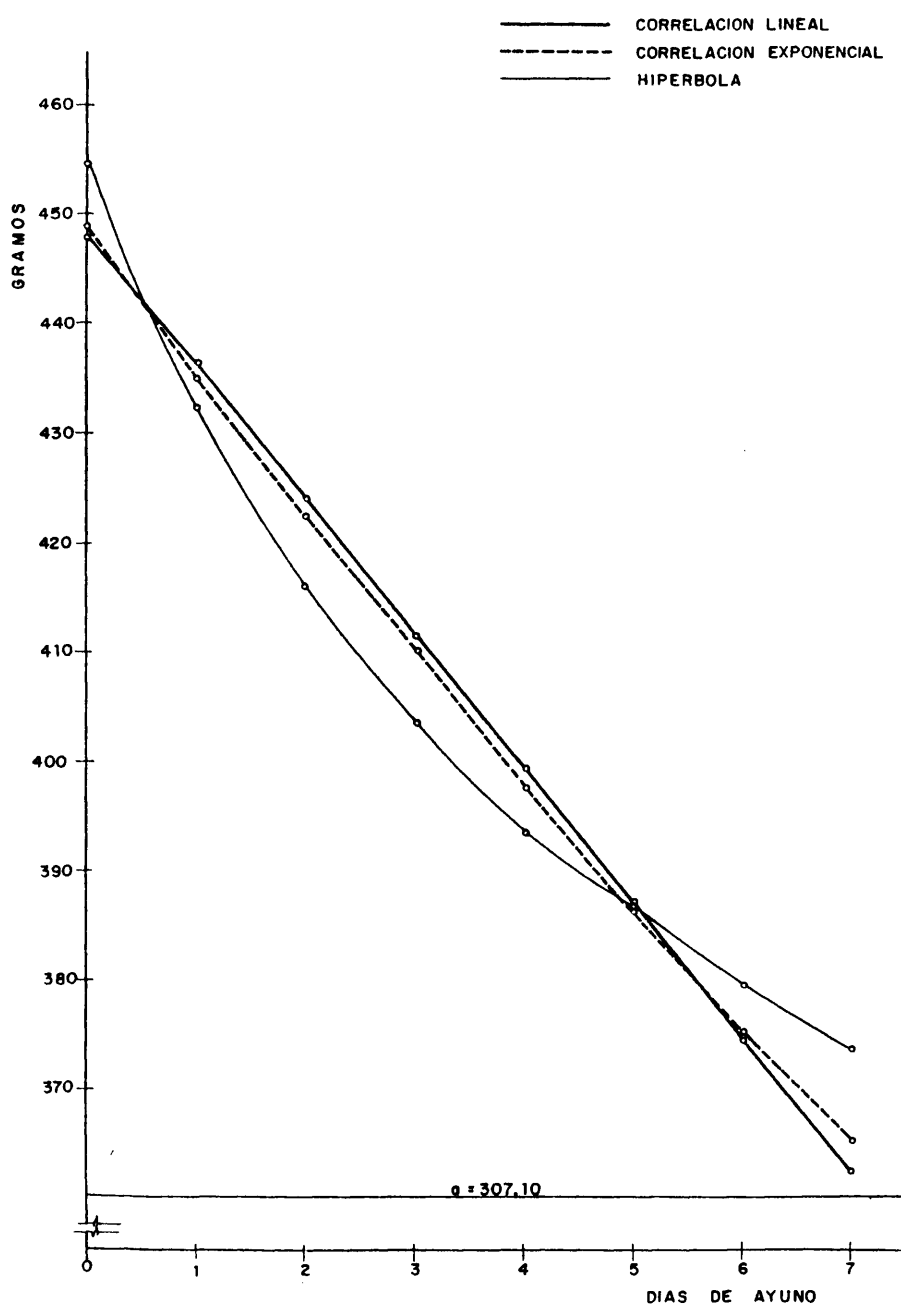


FIG. N° 30 - GRAFICO DE LAS TRES CORRELACIONES EFECTUADAS EN LOS PESOS EXPERIMENTALES DEL 4º GRUPO.

C U A D R O N° 15.

t	1 ^{er} grupo		2 ^a grupo		3 ^{er} grupo		4 ^a grupo	
	P _r	P _t	P _r	P _t	P _r	P _t	P _r	P _t
0	282,26	282,26	322,26	322,26	376,57	376,57	455,21	455,21
1	257,70	258,23	310,72	305,41	352,39	352,59	443,42	433,04
2	254,14	244,24	292,48	292,20	338,05	336,00	415,11	416,64
3	239,21	235,11	280,14	281,59	320,84	323,85	410,01	404,02
4	233,82	228,68	274,06	272,89	316,18	314,57	384,46	394,01
5	223,60	223,91	261,25	265,62	304,40	307,24	382,03	385,86
6	218,05	220,23	262,08	259,46	302,38	301,31	384,70	379,13
7	202,49	217,30	254,67	254,16	252,60	296,42	364,97	373,45

P_r = Pesos experimentales de los cuatro grupos.

P_t = Pesos teóricos, según la correlación hiperbólica.

	1er grupo	2º grupo	3er grupo	4º grupo
	$\bar{X}_r - \bar{X}_t$	$(\bar{X}_r - \bar{X}_t)^2$	$\bar{X}_r - \bar{X}_t$	$(\bar{X}_r - \bar{X}_t)^2$
0	0,53	0,2809	5,31	28,1961
1	6,90	47,6100	0,28	0,0784
2	4,10	16,8100	1,45	2,1025
3	5,14	26,4196	1,17	1,3689
4	0,31	0,0961	3,15	9,9225
5	2,18	4,7524	2,62	6,8644
6	14,81	219,3361	0,51	0,2601
		<hr/>		<hr/>
		315,3051		48,7929
				<hr/>
				216,0976
				<hr/>
				292,0148

\bar{X}_r = media aritmética de los pesos experimentales en cada día.

\bar{X}_t = media aritmética de los pesos hallados por el ajuste hiperbólico.

IV .b .3.- Tratamiento estadístico con pesos relativos.

Con el mismo razonamiento empleado en III. c. a fin de salvar la variabilidad que observamos en los pesos de las ratas, se aplica a cada uno de ellos la fórmula (14) que transforma los pesos reales de cada observación en pesos relativos y a ellos se les aplica en los cuatro grupos las correlaciones expuestas en el capítulo anterior.

Esta forma de estudiar los cuatro grupos en que hemos clasificado a las 50 ratas, nos permite tomar un punto inicial común para todas ellas, ya que a todos los pesos en el día 0 les hemos llamado 100% de peso inicial.

En el cuadro n° 18 detallamos los pesos relativos medios obtenidos a lo largo del ayuno en los cuatro grupos, el número de casos y desviaciones estandar.

Hemos de aclarar que estas dos formas de disponer nuestros datos no ofrecen mayor posibilidad de estudio que la de presentar de la forma más clara posible la afinidad existente entre las dos variables estudiadas.

Pasamos ahora con esta modificación a ajustar nuestras dos variables peso-relativo y tiempo, siguiendo el esquema ya trazado anteriormente

CUADRO N° 17.

a	42,857143	31,473347	67,28926	67,535629
b	8,189371	12,596656	3,918321	4,535629
k	467,964057	863,206675	128,171175	142,424601

a = asíntota de la hipérbola en cada grupo.

b y k = constante en la hipérbola según la ecuación (7).

CUADRO N° 18

Días	1 ^{er} grupo		2 ^a grupo		3 ^{er} grupo		4 ^a grupo	
	P.medio	(n) D.S.	P.medio	(n) D.S.	P.medio	(n) D.S.	P.medio	(n) D.S.
0	100,00		100,00		100,00		100,00	
1	93,69	5 1,6281	94,99	9 0,60	93,28	11 1,57	93,84	6 1,57
2	90,00	9 2,2392	90,60	14 1,40	89,21	9 1,75	90,74	10 2,32
3	85,49	7 2,1392	86,11	10 1,76	85,66	11 2,54	87,00	7 1,83
4	81,48	6 3,3823	82,42	7 2,58	84,99	6 0,75	83,28	8 3,11
5	78,53	5 3,2575	81,16	10 2,69	81,58	8 3,46	82,51	8 2,53
6	76,00	6 2,774	78,98	6 1,95	80,89	5 0,60	81,17	6 2,45
7	72,36	7 2,4011	76,88	6 2,097	75,08	6 3,22	79,45	9 2,74

Pesos relativos de los cuatro grupos con el número de casos (n) y la desviación estándar (D.S.) en cada grupo.

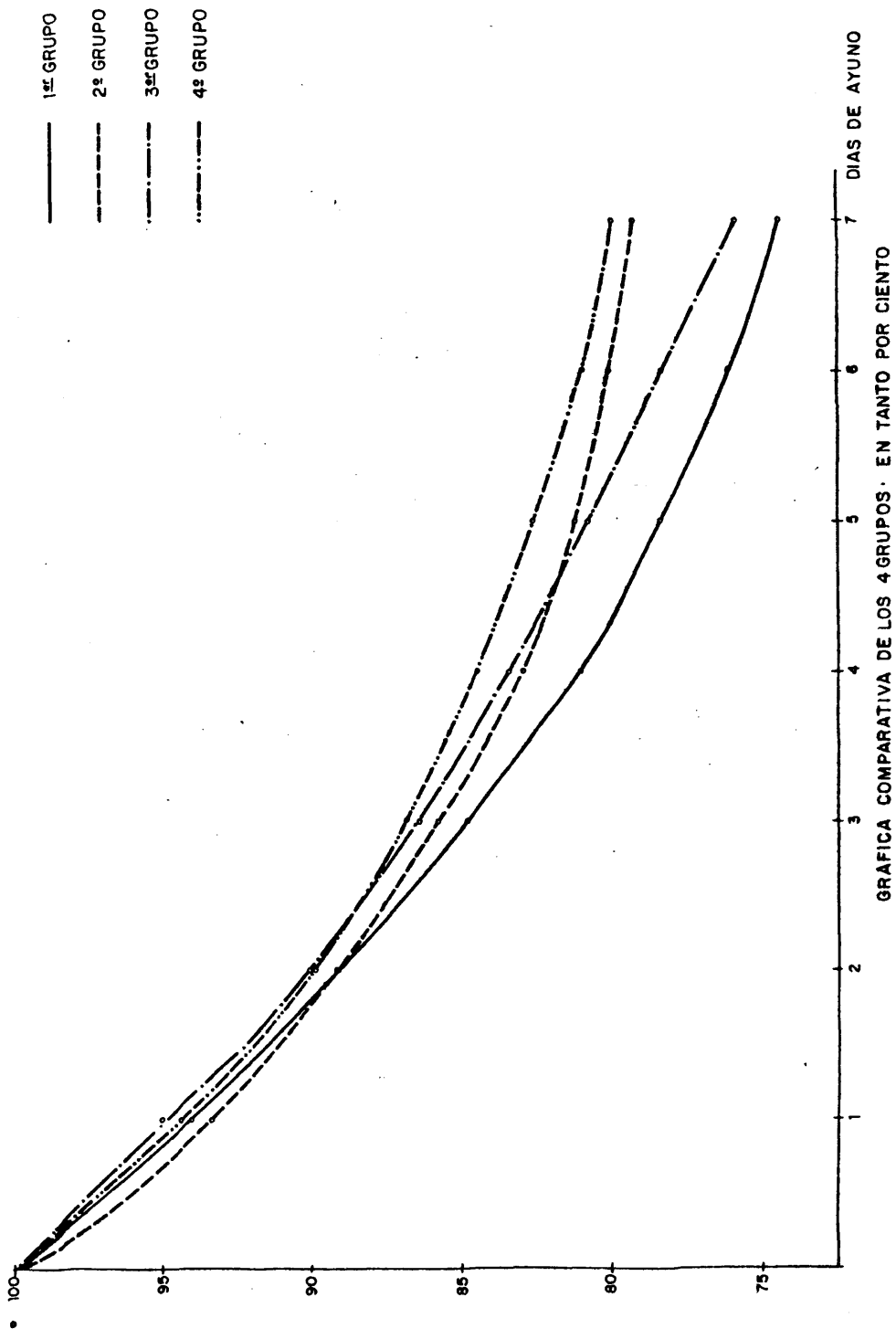
C U A D R O N º 19

t	1 ^{er} grupo		2 ^a grupo		3 ^{er} grupo		4 ^a grupo	
	P _r	P _t	P _r	P _t	P _r	P _t	P _r	P _t
0	100		100		100		100	
1	93,69	93,78	94,99	94,96	93,28	93,35	93,84	93,97
2	90,00	88,78	90,60	90,61	89,21	88,95	90,74	89,83
3	85,49	84,68	86,11	86,82	85,66	85,82	87,00	86,82
4	81,48	81,25	82,46	83,48	84,99	83,48	83,28	84,52
5	78,53	78,34	81,16	80,53	81,58	81,66	82,51	82,71
6	76,00	75,84	78,98	77,89	80,89	80,21	81,17	81,25
7	72,35	73,67	76,88	75,52	75,08	79,00	79,45	80,04

P_r = pesos medios relativos en cada día:

P_t = pesos medios relativos teóricos obtenidos mediante un ajuste hiperbólico.

18260



IV. c. . . Pérdida de peso diaria.-Expresada en función del peso del día anterior.

La influencia del peso del día anterior durante el ayuno, podría condicionar la pérdida de peso que experimenta el animal en cada día, esta hipótesis de trabajo nos ha marcado la pauta a seguir en la observación del comportamiento del peso en cada día y hemos creído que nos facilitaría nuestro trabajo al calcular cada día de ayuno la diferencia de peso respecto al que tenía el día anterior ($P_t - P_{t+1}$).

Como hemos representado los valores numéricos de las dos formas: en valor absoluto y en valor relativo, nos proponemos hacerlo también ahora; a tal fin en el cuadro nº 20, se disponen los tiempos y la pérdida de peso diaria de los cuatro grupos, con el número de observaciones y la desviación standard en cada día y en el cuadro número 21 los tiempos con las mismas diferencias expresadas en tanto por ciento.

En el cuadro nº 20 se puede comprobar que el primer día de ayuno la pérdida de peso no es la misma para los cuatro grupos, ello posiblemente se debe a que ratas de mayor peso pierden más que las de menos peso. Con el fin de ver la proporción de pérdida de peso en el ayuno y unificar esta pérdida para los cuatro grupos a fin de poder establecer comparaciones, realizamos esta otra forma de presentar los datos de la pérdida de peso diaria consistente en aplicar a cada peso P_t la siguiente transformación:

$$\text{tanto por ciento de pérdida de peso} = \frac{(P_t - P_{t+1})}{P_t} \times 100 \quad (25)$$

t	1 ^{er} grupo	(n)	D.S.	2 ^o grupo	(n)	D.S.	3 ^{er} grupo	(n)	D.S.	4 ^o grupo	(n)	D.S.
1	17,28	4	1,79	16,53	9	2,22	25,40	11	5,93	28,88	6	5,84
2	12,67	5	0,42	16,90	9	2,23	15,82	8	4,37	13,10	6	5,05
3	12,59	7	2,42	12,80	10	3,18	13,82	5	4,55	19,49	7	3,54
4	10,25	5	2,07	10,38	7	6,43	3,68	5	1,90	11,88	6	3,15
5	10,58	5	0,51	9,08	6	5,32	6,34	5	1,75	4,62	6	3,79
6	4,72	5	4,24	5,43	6	4,29	7,46	5	2,30	9,96	6	1,79
7	10,70	5	1,79	6,90	6	11,00	14,24	5	1,79	1,42	6	1,07

En columna se representa la pérdida de peso en gramos en cada día, calculado en los cuatro grupos, el número de observaciones (n) y la desviación estandard (D.S.) de cada una de ellas.

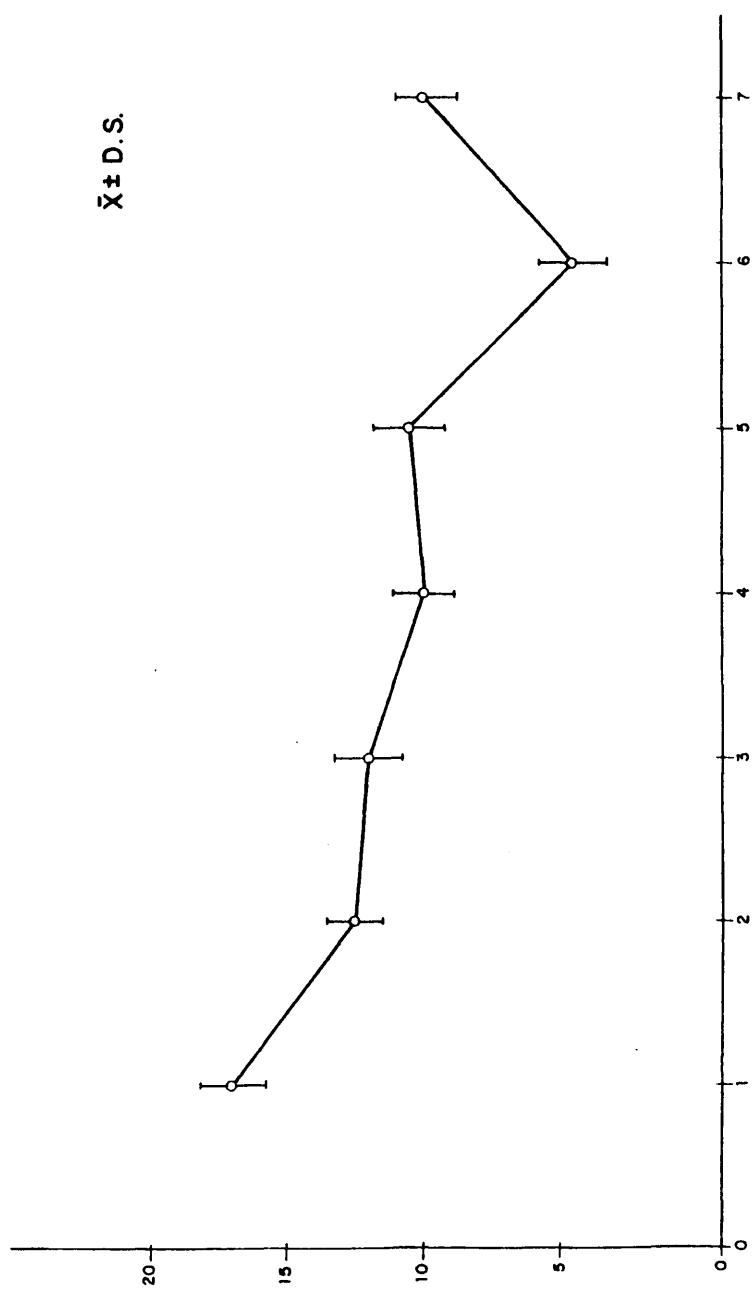


FIG. Nº 31. - PERDIDA DE PESO DIARIO EN VALOR ABSOLUTO RESTANDO CADA DIA EL PESO DEL DIA ANTERIOR.
GRUPO 12

$\bar{X} \pm D.S.$

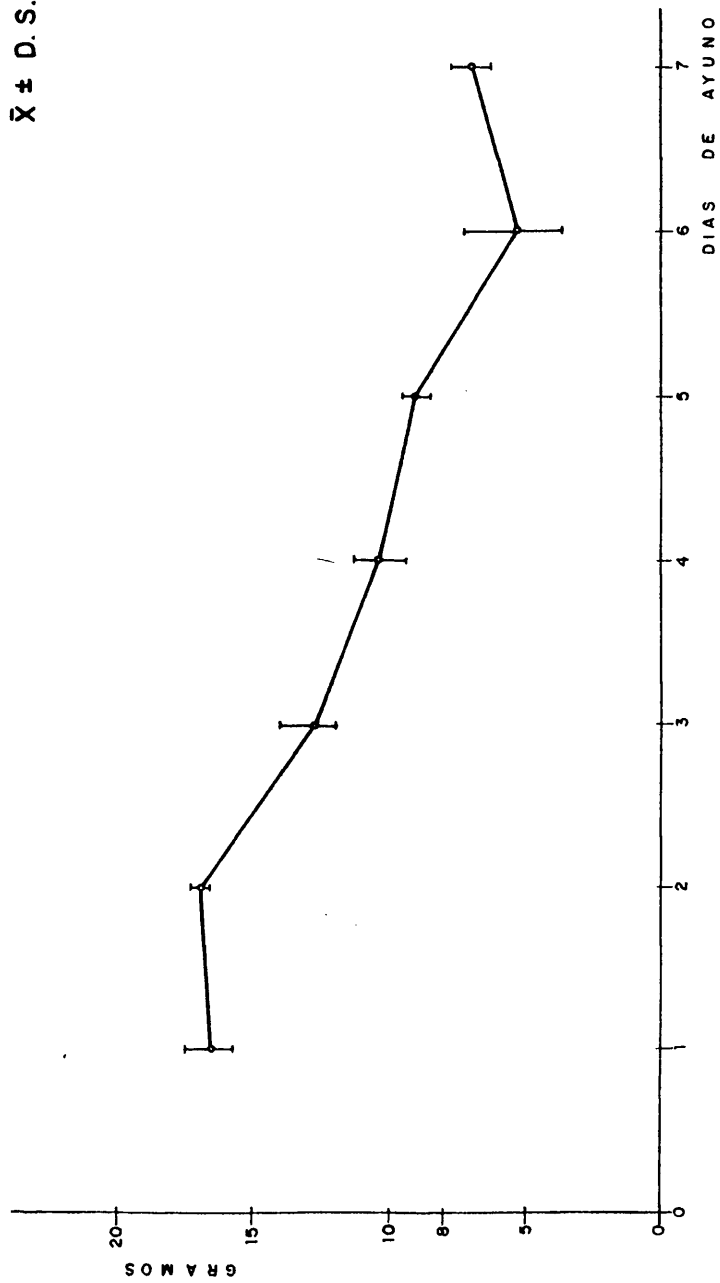


FIG. N° 32 - PERDIDA DE PESO DIARIA EN VALOR ABSOLUTO, RESTANDO CADA DIA EL PESO DEL DIA ANTERIOR.
GRUPO 29

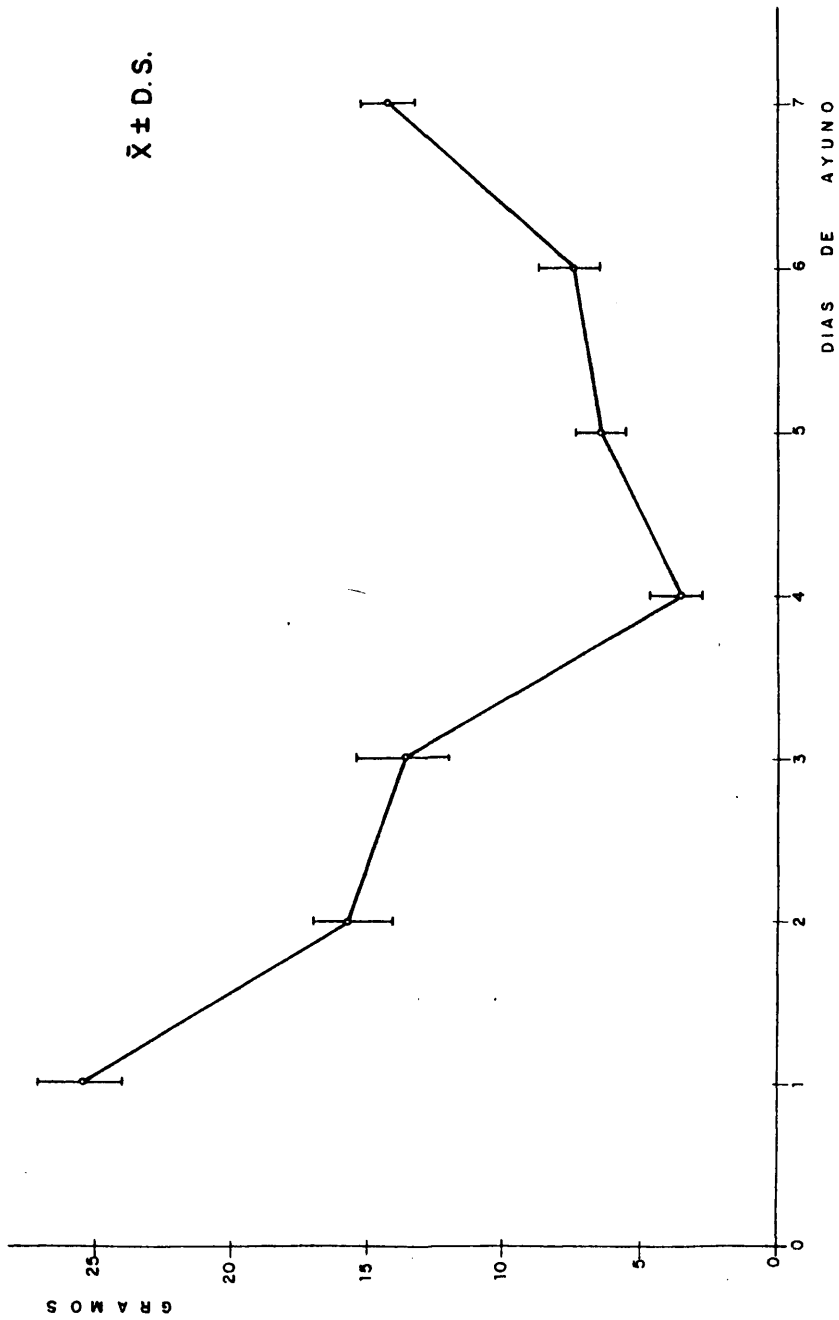


FIG. N.º 33 - PERDIDA DE PESO DIARIO EN VALOR ABSOLUTO, RESTANDO DE CADA DIA EL PESO DEL DIA ANTERIOR.

GRUPO 20

$\bar{X} \pm D.S.$

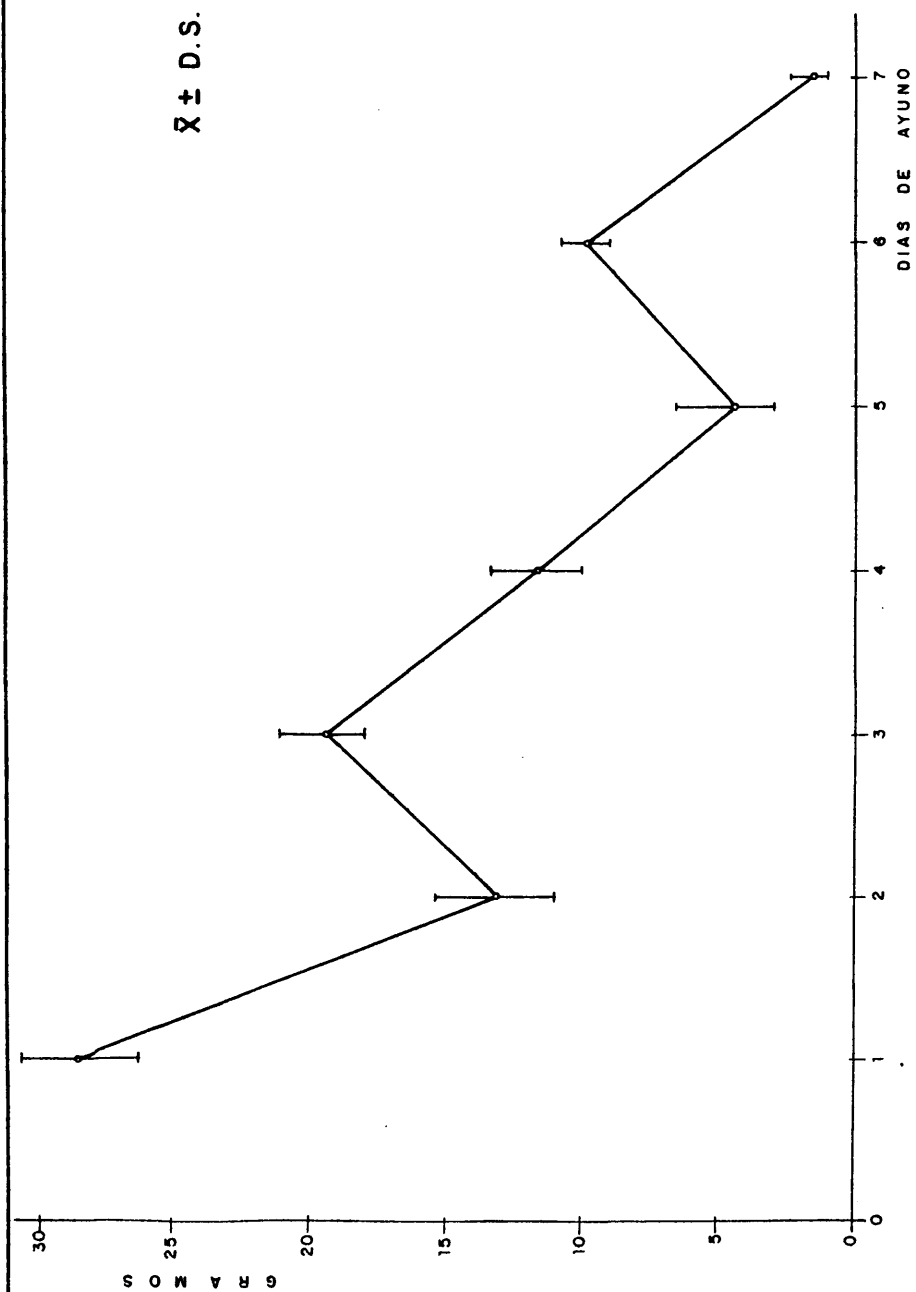


FIG. Nº 34 - PERDIDA DE PESO DIARIO EN VALOR ABSOLUTO, RESTANDO CADA DIA EL PESO DEL DIA ANTERIOR.
GRUPO 42

Resumimos en el siguiente cuadro los resultados de transformar la pérdida de peso diario en tanto por ciento, según (16) y podemos observar que el grupo de mayor peso (mayores de 400 gramos) es el que más se diferencia de los restantes en cuanto a pérdida de peso diario, ya que además de experimentar menor pérdida de peso relativo, lo hace de forma menos uniforme que las observaciones de los otros tres grupos.

CUADRO N° 21.

t	1 ^{er} grupo	2 ^a grupo	3 ^{er} grupo	4 ^a grupo
1	6,12	5,13	6,75	6,34
2	4,92	5,43	4,49	2,95
3	4,95	4,39	4,09	4,69
4	4,28	3,70	1,14	2,89
5	4,73	3,31	2,00	1,19
6	2,16	2,06	2,45	2,59
7	5,28	2,70	4,70	0,36

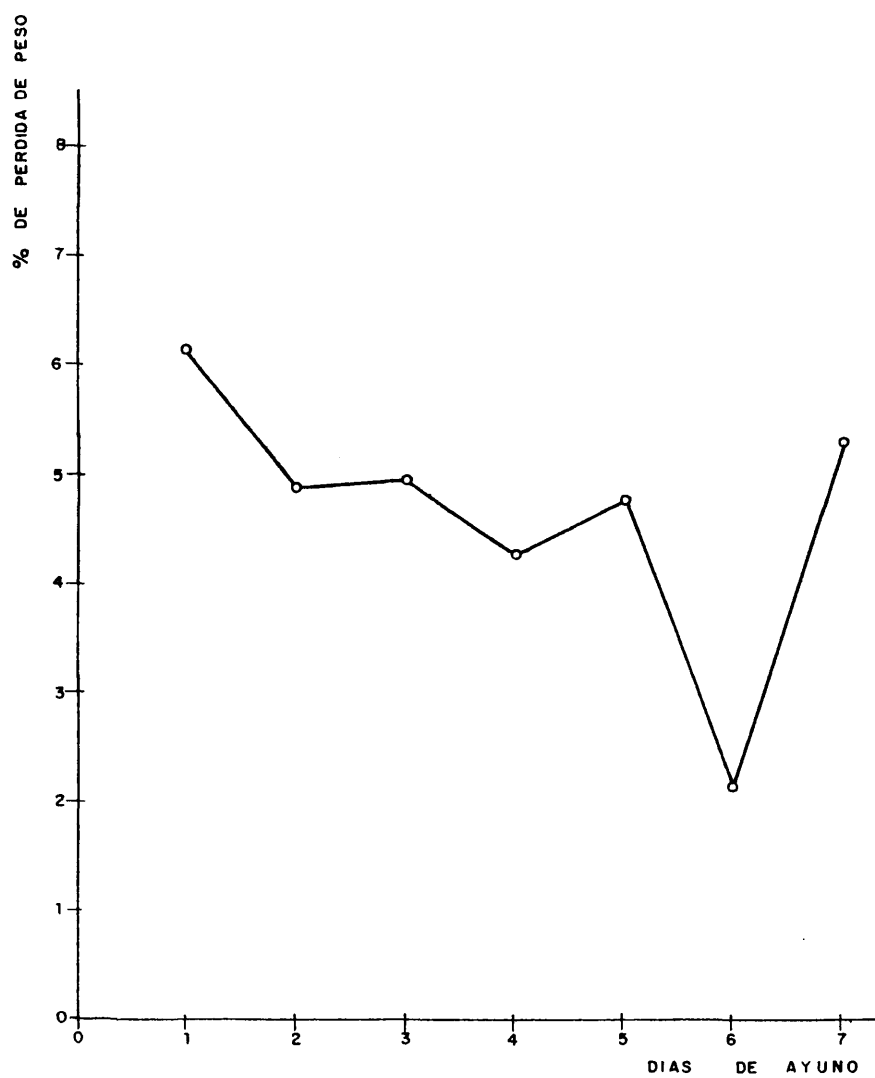


FIG. N° 35 - TANTO POR CIENTO DE PERDIDA DIARIA DE PESO PARA LAS RATAS DEL 1º GRUPO.

III

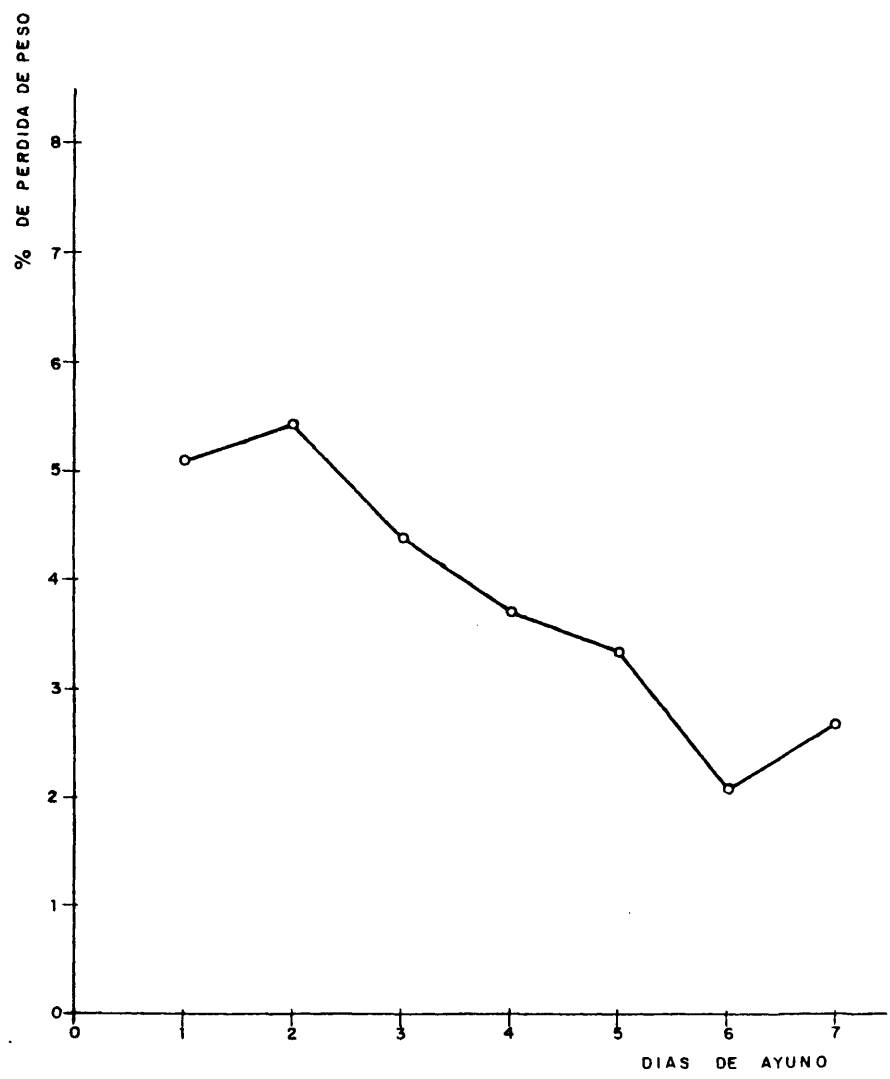


FIG. N° 36 - TANTO POR CIENTO DE PERDIDA DE PESO DIARIA PARA LAS RATAS DEL 2º GRUPO.

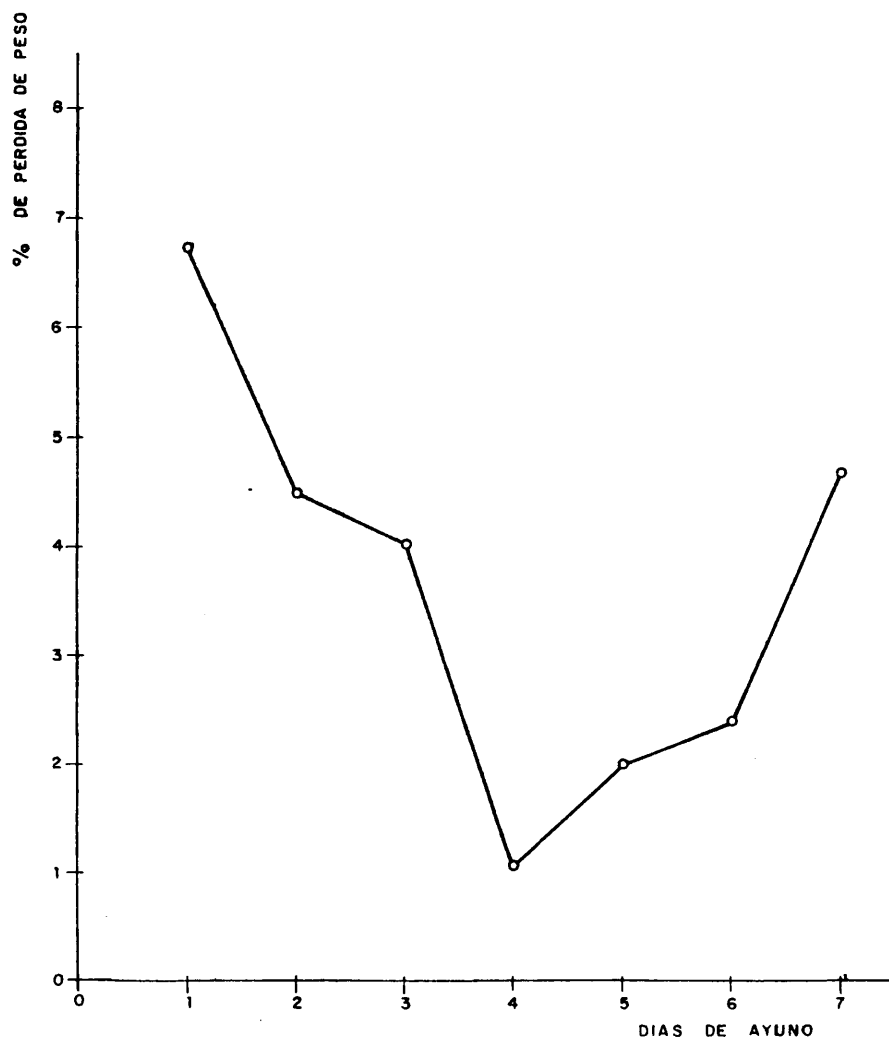


FIG. N° 37 - TANTO POR CIENTO DE PERDIDA DIARIA DE PESO PARA EL 3º GRUPO

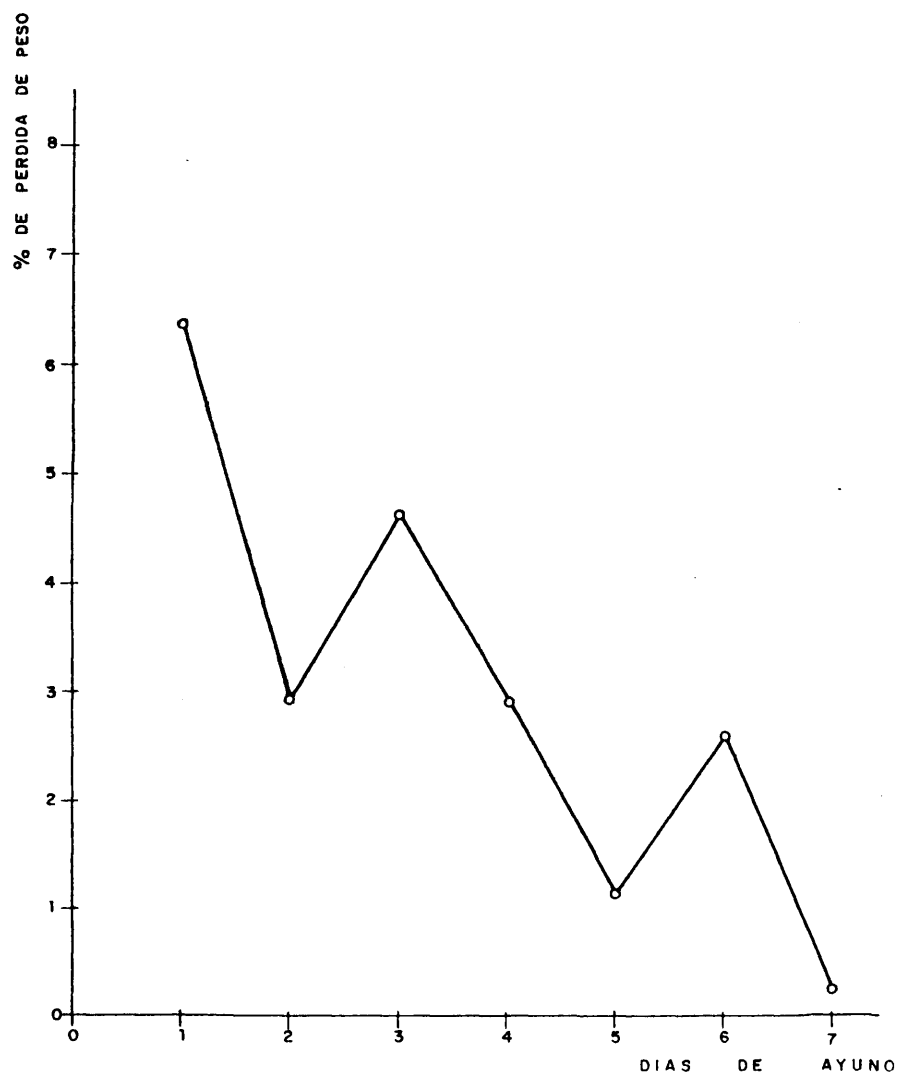


FIG. N° 38 — TANTO POR CIENTO DE PERDIDA DE PESO DIARIO PARA LAS RATAS DEL 42 GRUPO.

IV. d. 1.- Pérdida de peso a lo largo del ayuno.- Expresada en función del peso inicial.

En este capítulo intentamos objetivar en qué medida se produce la pérdida de peso corporal en un ayuno de siete días, que es el que nosotros hemos llevado a cabo en nuestro trabajo experimental. Valiéndonos de la clasificación del capítulo II, en la que ha servido como referencia el peso inicial o del comienzo del ayuno, vamos a desarrollar este planteamiento; para ello con la pérdida de peso que cada animal experimenta en cada día hemos realizado una operación aditiva durante los siete días, de tal forma que al finalizar el ayuno de siete días obtenemos como resultado una pérdida de peso total, expresada en gramos.

Con los datos de esta operación, tabulados y ordenados, realizamos el estudio estadístico correspondiente, que presentamos en el cuadro nº 22.

Igualmente siguiendo la pauta anterior de representar los datos obtenidos en valor absoluto y en tanto por ciento, pasamos a hacer esta segunda presentación de nuestros resultados, tal como queda en el cuadro nº 23.

Vemos así que esta manera de expresar en tanto por ciento de pérdida de peso adquiere una gran uniformidad, así como se mejoran las medidas de tendencia central calculadas.

C U A D R O N.º 22.

	1er grupo		2º grupo		3er grupo		4º grupo	
	P _t	(n) D.S.	P _t	(n) D.S.	P _t	(n) D.S.	P _t	(n) D.S.
1	17,28	4 4	16,53	9 2,35	25,40	11 5,93	28,88	6
2	29,00	8 5,58	30,58	14 5,36	40,69	9 6,64	41,91	9 9,71
3	37,97	8 7,62	45,47	10 7,30	53,80	11 9,72	59,03	8 8,27
4	53,03	6 8,74	58,73	7 10,38	56,70	6 2,64	73,39	7 5,73
5	60,82	5 6,85	61,32	10 10,99	68,93	8 13,06	80,44	8 8,56
6	68,87	6 8,01	69,27	6 8,13	71,44	5 1,82	88,72	6 9,15
7	77,09	7 5,27	76,68	6 8,57	92,34	7 11,33	94,31	9 9,06

P_t = pérdida de peso experimentada en cada día de ayuno, a partir del peso inicial (P₀-P_t).

n = número de observaciones.

D.S.= desviación estandard en cada día.

	P_t	(n)	D.S.	P_t	(n)	D.S.	P_t	(n)	D.S.	P_t	(n)	D.S.
1	6,12	5	1,41	5,13	9	0,56	6,75	11	1,26	6,34	6	1,43
2	10,07	9	2,11	9,80	14	1,64	11,08	9	0,38	9,26	10	2,20
3	14,57	7	2,03	15,30	10	2,02	14,30	12	0,67	12,99	7	1,69
4	18,59	6	3,13	19,15	7	2,24	15,43	5	0,25	15,64	8	1,34
5	21,55	5	2,97	21,19	10	3,20	18,43	8	3,24	17,51	8	2,35
6	24,04	6	2,55	23,40	6	2,89	19,11	5	0,53	18,82	6	2,23
7	28,74	7	2,65	25,71	6	3,12	24,06	6	1,08	20,43	9	2,59

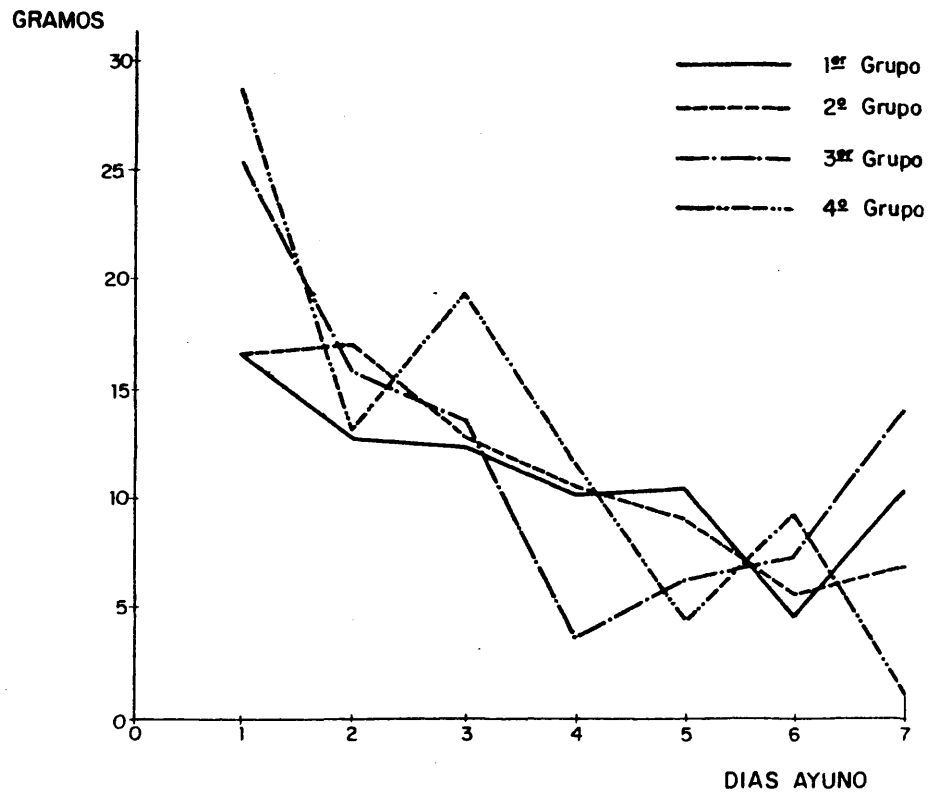
P_t = pérdida de peso experimentado cada día de ayuno, expresándolo en tanto por ciento, a partir del peso inicial.

n = número de observaciones.

D.S.= desviación estandard en cada día.

176 bis

FIG. 39 - PERDIDA DE PESO DIARIO EN VALOR ABSOLUTO
COMPARACION DE LOS 4 GRUPOS



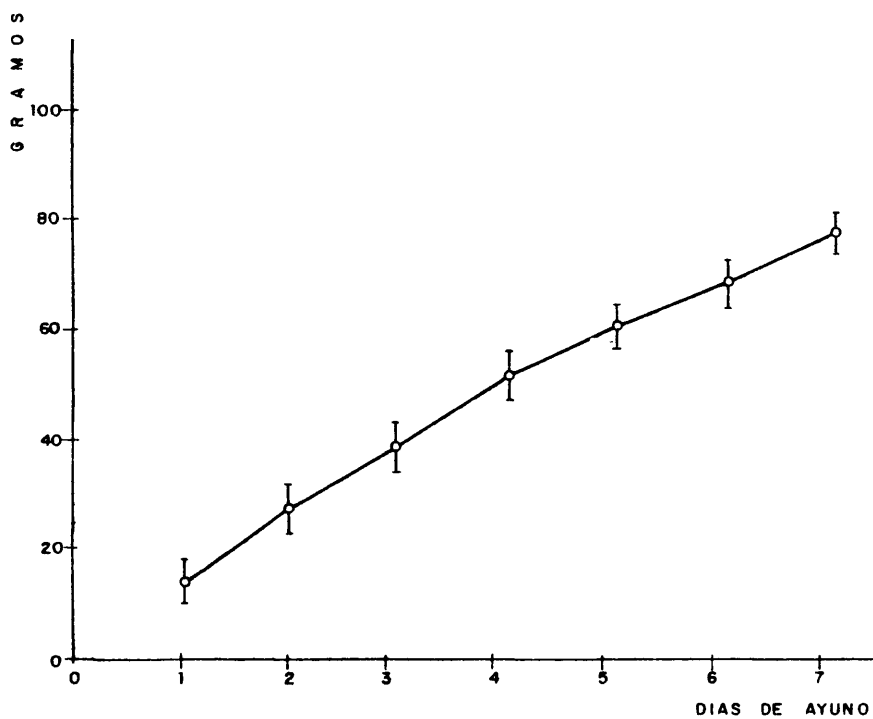
$\bar{X} \pm D. S.$ 

FIG. N° 40 - PERDIDA DE PESO DIARIO, OBTENIDO RESTANDO AL PESO INICIAL EL PESO DE CADA DIA ($P_0 - P_i$) PARA EL GRUPO 12 DE RATAS

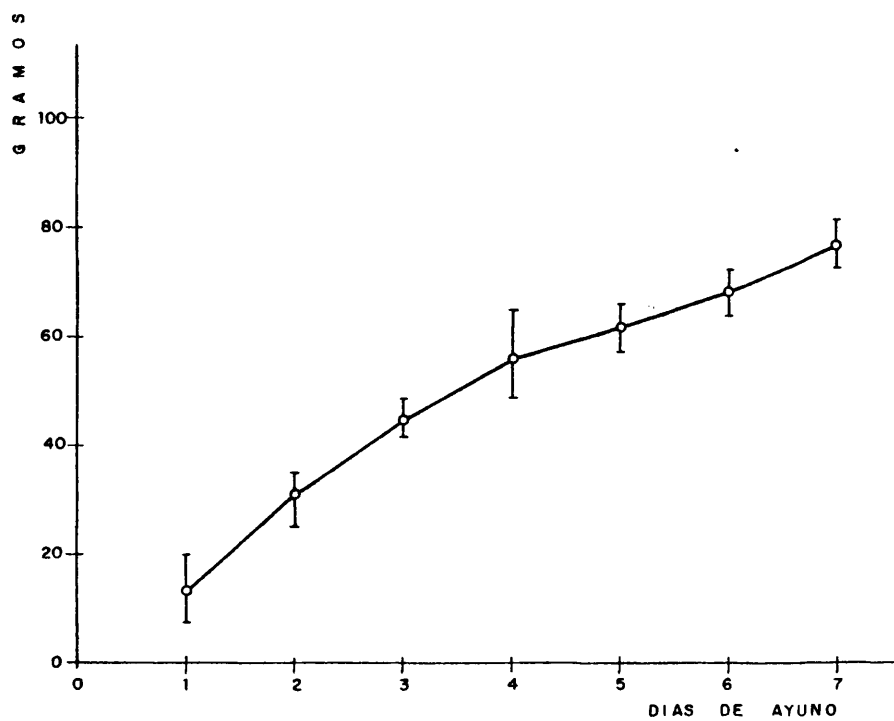
$\bar{X} \pm D.S.$ 

FIG. N° 41 - PERDIDA DE PESO DIARIO, OBTENIDO RESTANDOLE AL PESO INICIAL EL PESO DE CADA DIA ($P_0 - P_1$) PARA EL GRUPO 2º DE RATAS.

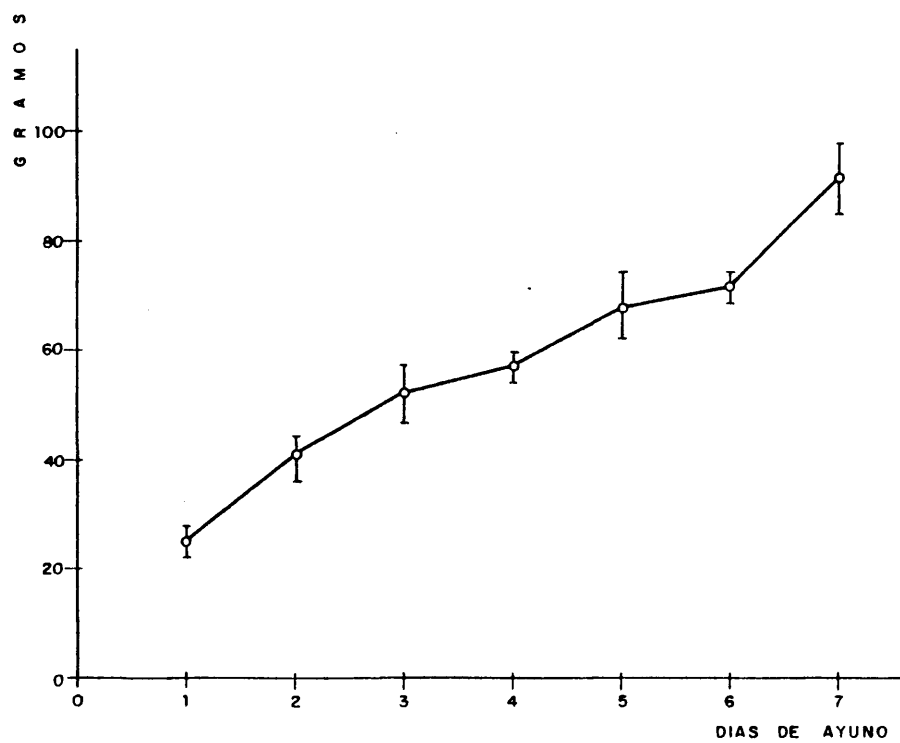
$\bar{X} \pm D. S.$ 

FIG. Nº 42 - PERDIDA DE PESO DIARIO, OBTENIDO RESTANDOLE AL PESO INICIAL EL PESO DE CADA DIA ($P_0 - P_1$) PARA EL 3º GRUPO

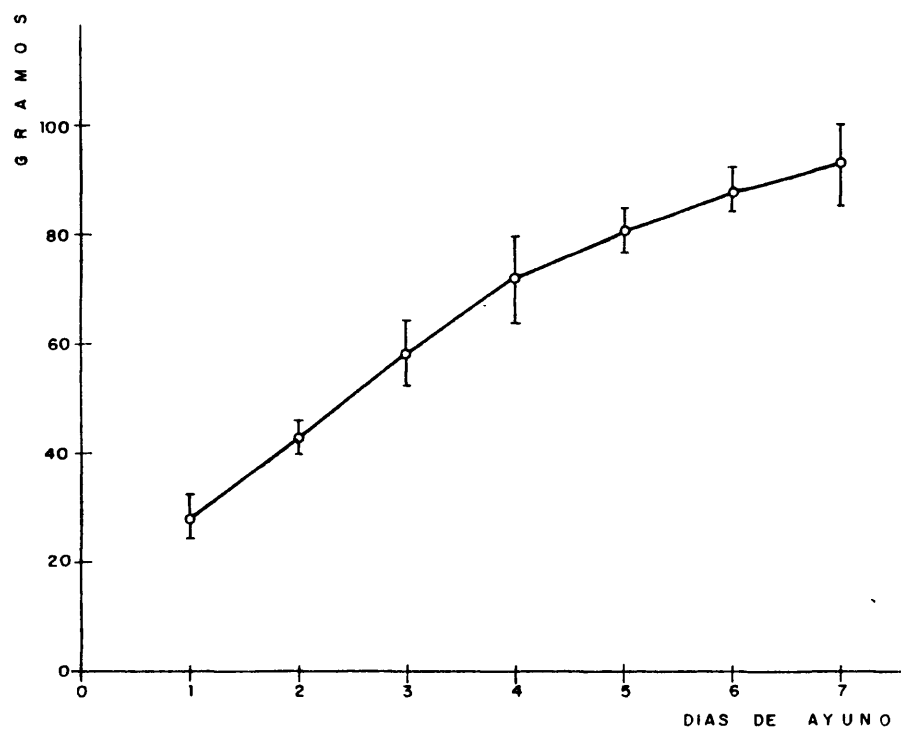


FIG. Nº 43 - PERDIDA DE PESO DIARIO, PARA LAS RATAS DEL 4º GRUPO, OBTENIDO RESTANDOLE AL PESO INICIAL, EL PESO DE CADA DIA ($P_0 - P_1$).

En el cuadro n^o 23, donde hemos representado la pérdida de peso experimentada cada día de ayuno en tanto por ciento, observamos que esta pérdida en el primer día se realiza para los cuatro grupos, aparentemente, con uniformidad.

Siguiendo la evolución del ayuno, en el día 2 también es uniforme la pérdida, pero ya a partir del 3^{er} día, notamos que se rompe, pues aunque la mantienen los tres primeros grupos, el 4^a se comienza a retrasar.

Posteriormente en el día 4, los grupos 1^a y 2^a continúan uniformes en su pérdida, mientras que el 3^a y el 4^a comienzan a retrasar esta pérdida (el 4^a grupo de forma más ostensible).

En el día 5 del ayuno, continúa esta diferencia, remarcando el retraso del día 4 y observándose un pequeño aumento de pérdida en el 1^{er} grupo.

Los días 6 y 7 establecen ya una diferencia acusada entre los grupos 1^a y 2^a con el 4^a, manifestándose el 3^{er} grupo, con un carácter intermedio en cuanto a su pérdida final.

De esta forma demostramos que la pérdida de peso a lo largo del ayuno, se hace con uniformidad para los cuatro grupos en el 1^{er} día y posiblemente en el 2^a, no manteniéndose esta uniformidad los restantes días estudiados.

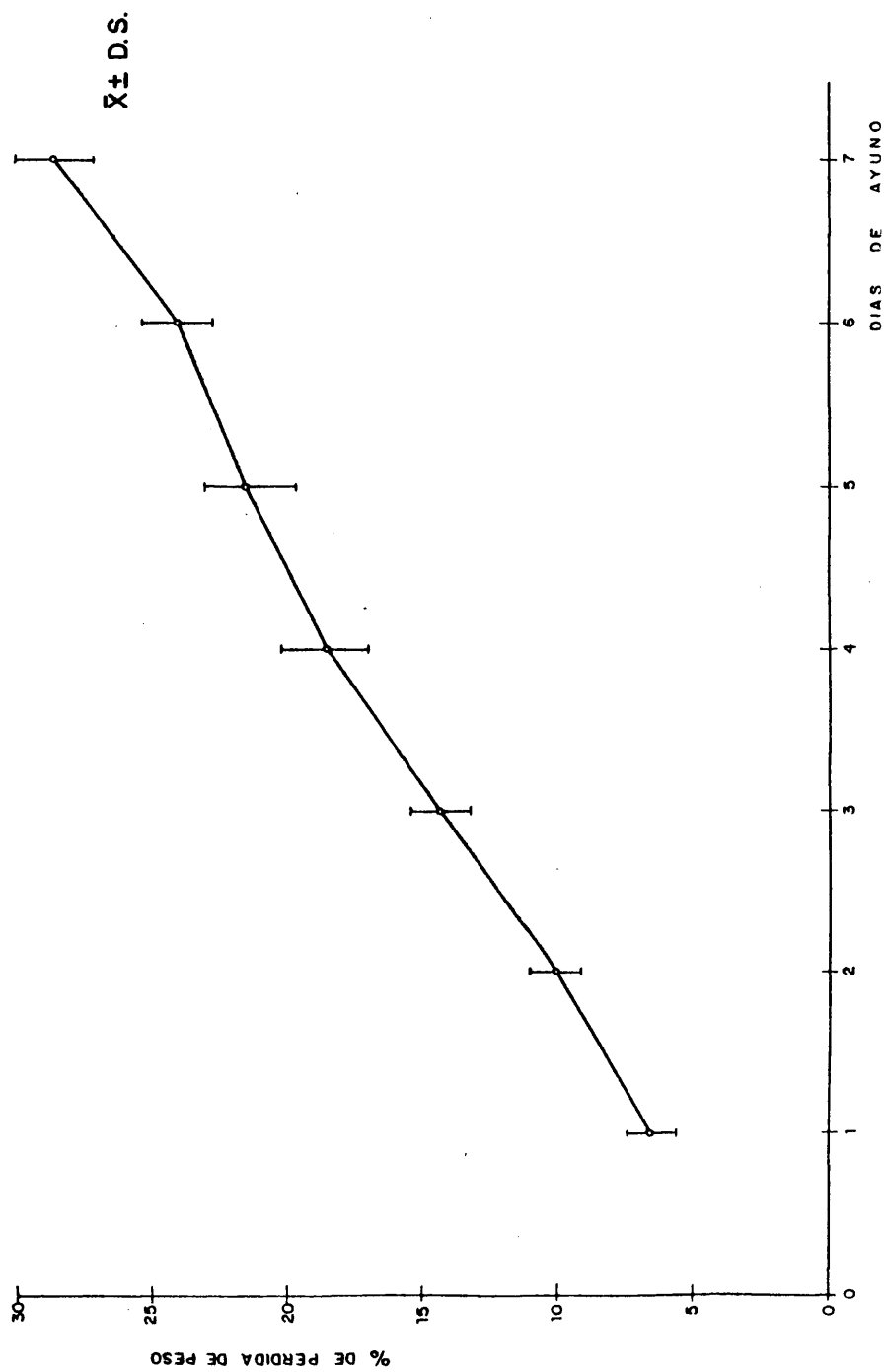


FIG. N° 44 - TANTO POR CIENTO DE PERDIDA DE PESO DIARIO, A PARTIR DEL PESO INICIAL PARA EL 1º GRUPO.

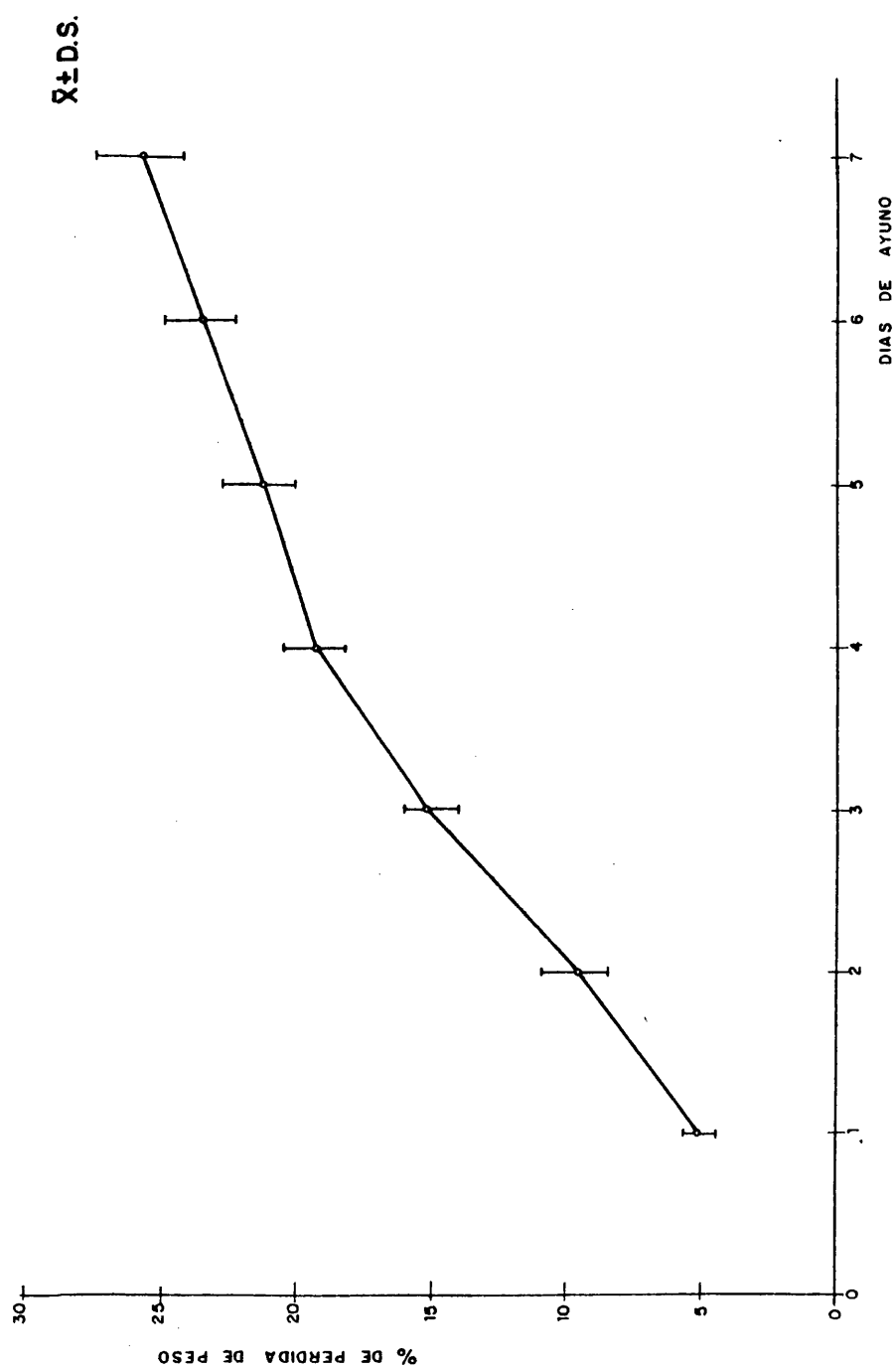


FIG. N° 4.5 - TANTO POR CIENTO DE PERDIDA DE PESO DIARIO, A PARTIR DEL PESO INICIAL, PARA EL 22 GRUPO.

$\bar{X} \pm D.S.$

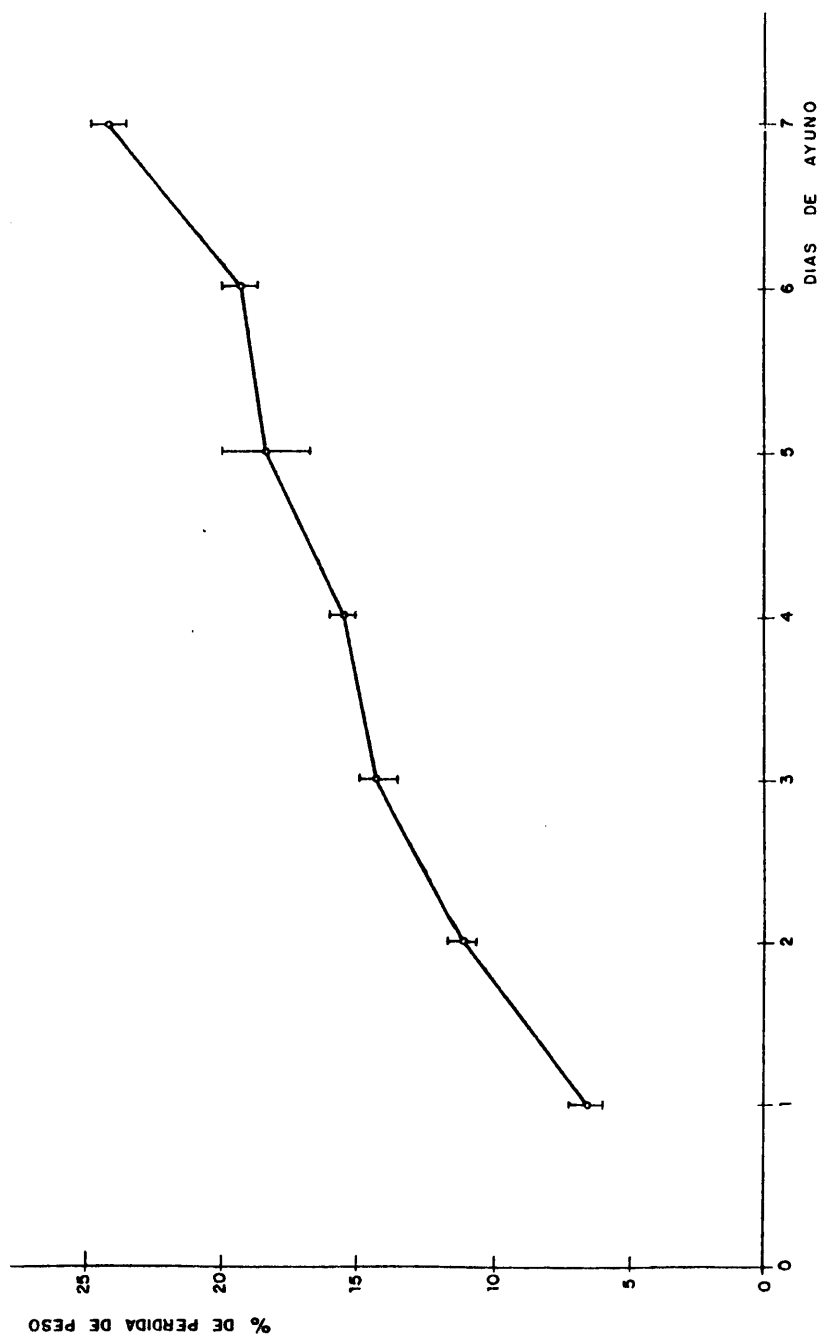


FIG. N° 46 - TANTO POR CIENTO DE PERDIDA DE PESO, A PARTIR DEL PESO INICIAL PARA EL 3º GRUPO.

$\bar{X} \pm D.S.$

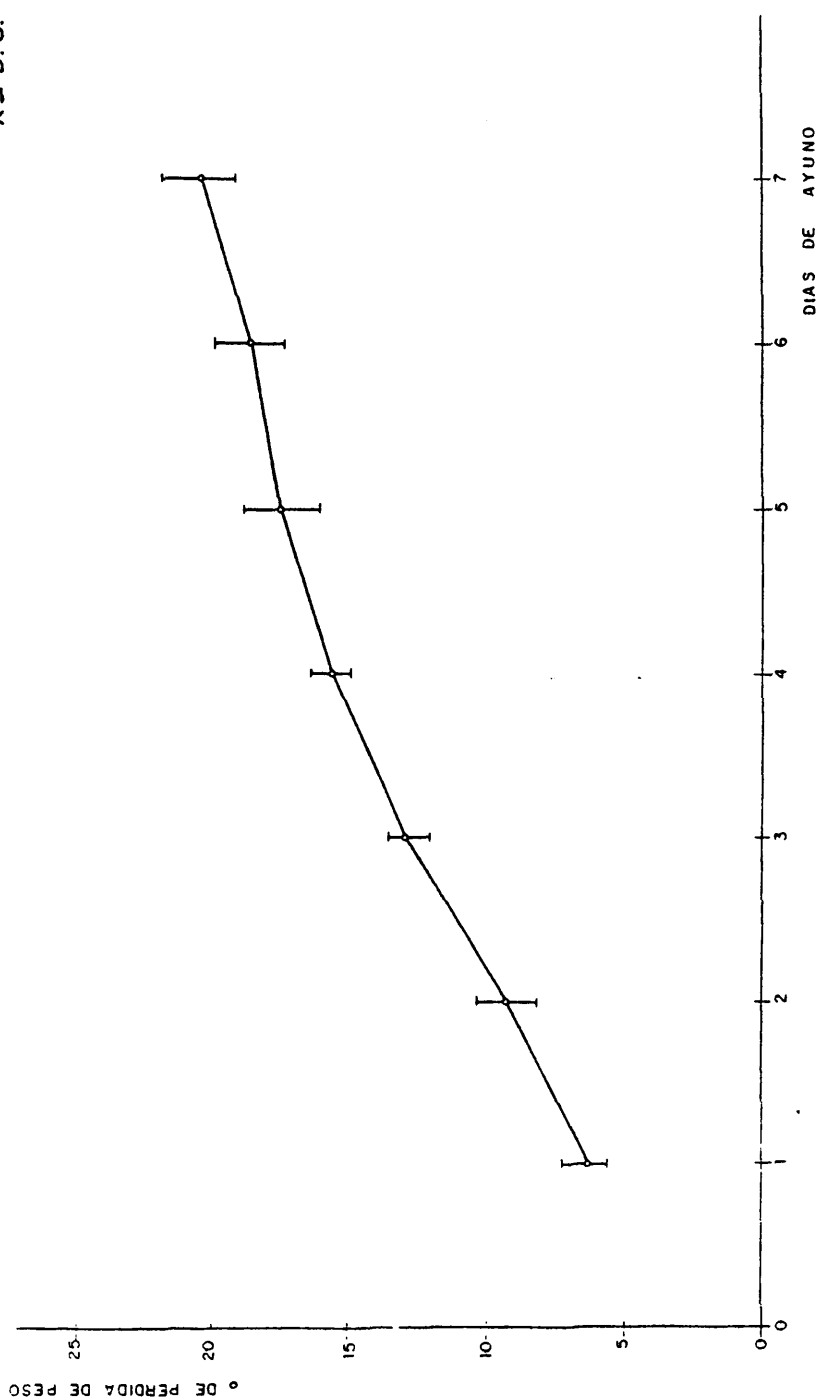


FIG. N° 47 - TANTO POR CIENTO DE PERDIDA DE PESO DIARIO, A PARTIR DEL PESO INICIAL PARA EL 42 GRUPO.

IV. c. Resultados de las determinaciones de glucosa.

Las glucemias se determinaron en los animales de experimentación sometidos a siete días de ayuno, por el método ya descrito en el capítulo III.d.1 de la Orto toluidina.

Las muestras analizadas, no lo fueron en un sólo día, sino que se llevaron a cabo fraccionadamente a lo largo de cinco días de análisis, de aquí que en III.d. hallamos expuesto las cinco correlaciones efectuadas con la curva patrón que en cada determinación se introdujo y respecto a las cuales se calcularon los valores teóricos en cada día.

La sangre en las ratas se obtuvo, previo aturdimiento del animal, de la vena yugular en unas y en otras por decapitación. Algunos de los sueros separados presentaban una ligera hemólisis debido a la labilidad de los hematíes de la sangre de las ratas, por lo que fué necesario descartarlos en estas determinaciones.

Llevamos a cabo el análisis de las muestras por duplicado y la lectura se hizo en un espectrofotómetro Spectronic 20 a una longitud de onda de 620 nm.

En el cuadro nº 24 disponemos en columna las concentraciones teóricas obtenidas en cada uno de los cinco días de análisis, una vez ajustadas a su correspondiente curva patrón.

Con los valores obtenidos hemos hallado las medias aritméticas y las desviaciones estándar de las cinco determinaciones de cada día de ayuno tal como a continuación se detallan con el fin de seguir uniformadamente la evolución de la glucosa a lo largo de los siete días de ayuno.

CUADRO N° 24

días de ayuno	0	1	2	3	4	5	6	7
\bar{x}	147,53	102,34	93,11	97,48	108,89	84,19	104,51	114,70
n	13	11	6	8	6	7	7	4
D.S.	19,57	12,86	9,72	10,09	16,44	11,25	12,33	15,87

Estos valores están representados gráficamente en la fig. n° 48 que nos resalta el mantenimiento homeostático de la glucemia en el ayuno a expensas de los mecanismos que intervienen en su regulación como anteriormente se expuso (cap. I.c.1).

El día considerado como $t=0$, es el que corresponde al momento en que se retira la comida, ello explica, ya que el animal está saciado, la elevación de glucosa encontrada respecto a la que se observa en el día 1 del ayuno. El valor encontrado en nuestro experimento para $n=13$ es de $147 \pm 19,57$ ng/100 ml.

Si el valor correspondiente a la concentración de glucosa hallada en el día 1 de ayuno lo tomamos como control para estudiar la evolución de la glucemia en los 7 días, podemos pues hacer el estudio con respecto a él; entonces consideramos como glucemia basal la comprendida dentro del intervalo 89,48 - 115,20 ng/100 ml. ($102,34 \pm 1$ D.S.).

Las glucemias encontradas por nosotros en nuestro trabajo experimental difieren de las que en el Handbood of Biological data se nos presentan como valores normales en ratas (pág.310).

Buscando en la literatura una explicación a esta dife

rencia, no hemos encontrado unanimidad para determinar cual es el momento fisiológico del ayuno en las ratas en condiciones normales.

Algunos laboratorios lo que hacen es apartar la comida del animal a las 20 h.p.m. y después se la reponen a las 8 h. de la mañana del día siguiente, dejándosela sólo una hora para que coma el animal y se la apartan nuevamente.

Desde este momento dejan transcurrir ocho horas y a éste tiempo le denominan "ayuno fisiológico en las ratas".

Para no interrumpir el ritmo establecido de pesar al animal es por lo que extraemos sangre a las 24 horas de haberle retirado la comida, con lo que nos es posible relacionar dos parámetros: pesos y glucemias.

Siguiendo nuestro razonamiento todos los valores que se encuentran entre 89,48 y 115,20 mg/100 ml (valores extremos del día 1), vamos a considerarlos como valores normales en glucemia en nuestras ratas; aquellos que se encuentran por debajo ó por encima del mismo los consideramos como alteración debido al proceso estudiado.

Escribimos a continuación los valores mínimo y máximo de las concentraciones halladas en cada día obtenidos restándole y sumándole respectivamente a la media aritmética calculada en cada día una desviación estandard.

CUADRO N° 25

días de ayuno	intervalo normal	mínimo y máximo
1	89,48 - 115,20	89,48 - 115,20
2	" "	83,39 - 102,83
3	" "	87,39 - 107,57
4	" "	92,45 - 125,33
5	" "	72,94 - 95,44
6	" "	92,18 - 116,84
7	" "	98,83 - 130,57

La observación directa de los valores así obtenidos nos lleva a hacer un estudio de la t de Student entre ellos.

De la comparación de la media de los valores de glucosa en el día 1 con respecto a los días siguientes se obtienen las siguientes t de Student.

CUADRO N° 26

g.l.	días	t	P
15	1 - 2	1.53	< 0.20
17	1 - 3	0.89	< 0.40
15	1 - 4	0.91	< 0.40
16	1 - 5	3.06	< 0.01
16	1 - 6	0.35	< 0.80
13	1 - 7	1.55	< 0.20

que nos permiten afirmar que la concentración de glucosa que más se aparta de la obtenida en el día 1 es la correspondiente al día 5 de ayuno.

C U A D R O N° 27

	G_t	n	D.S.	G_t	n	D.S.	G_t	n	D.S.	G_t	n	D.S.
\bar{X}_1	96,19	(4)	12,50	108,03	(4)	14,28	91,35	(4)	11,65	102,57	(3)	13,15
\bar{X}_2	103,57	(3)	9,50	90,50	(3)	8,60	103,06	(3)	9,90	92,02	(4)	10,90
\bar{X}_3	95,93	(3)	9,45	104,13	(3)	10,11	101,85	(3)	11,00	89,64	(4)	10,37
\bar{X}_4	127,07	(3)	15,80	103,01	(3)	16,20	93,21	(3)	14,45	120,00	(3)	19,65
\bar{X}_5	85,76	(4)	15,20	97,87	(3)	17,15	90,38	(3)	13,65	71,67	(3)	11,20
\bar{X}_6	100,16	(4)	14,00	94,92	(3)	12,10	102,85	(4)	10,30	99,00	(3)	12,15
\bar{X}_7	108,07	(4)	15,20	120,03	(3)	16,65	96,87	(3)	18,15	133,82	(3)	15,10
										114,71	(3)	14,25

\bar{X} media aritmética de los valores teóricos de Glucemia en cada día.

n número de observaciones.

D.S. desviación estandard de las medias aritméticas.

G_t glucemias ajustadas según una correlación lineal a las curvas patrón.

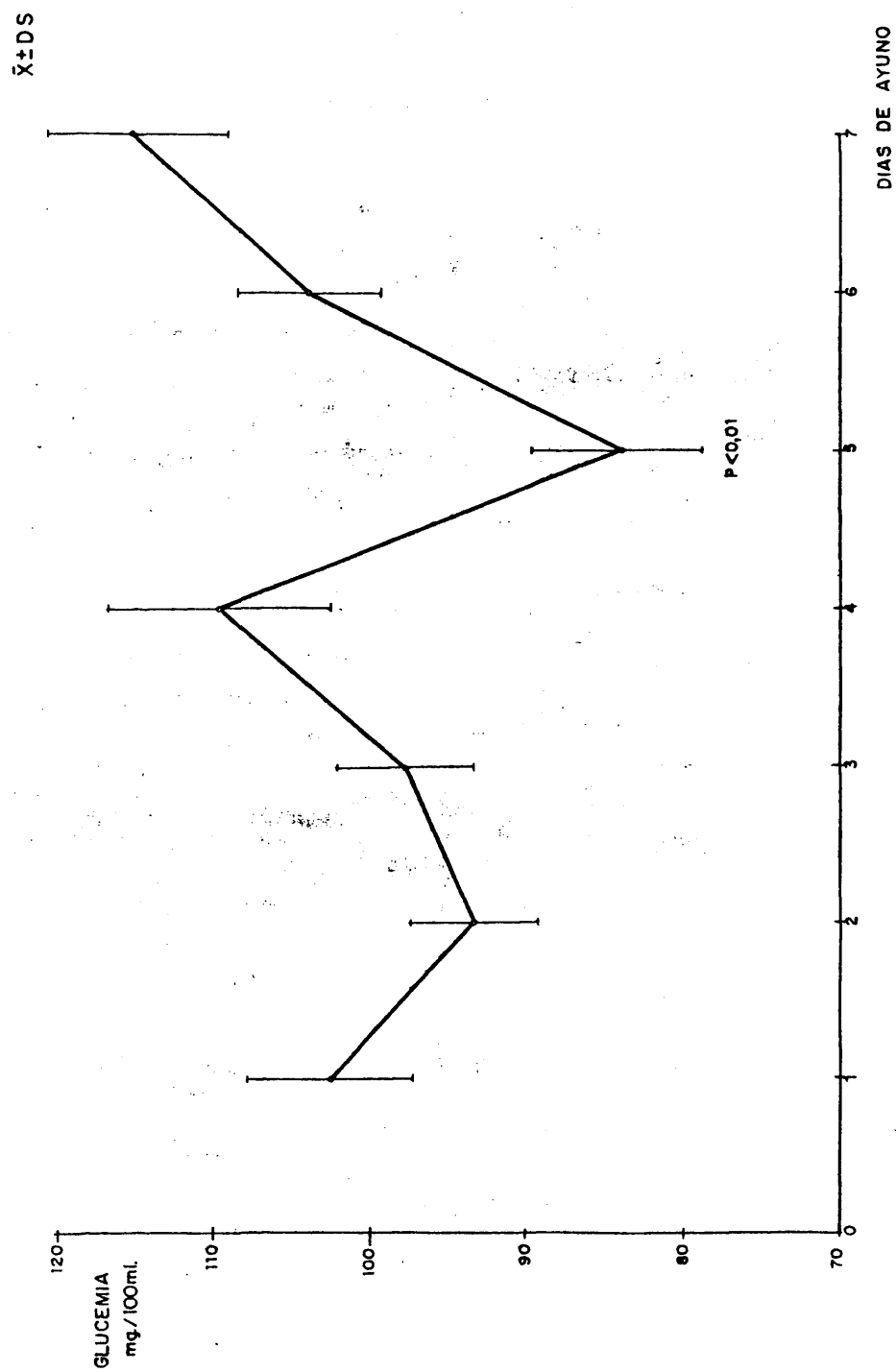


FIG. Nº 48 -EVOLUCION DE LA GLUCEMIA EN EL AYUNO.

IV. f. Resultados de las determinaciones de lípidos totales.

El método para la determinación de lípidos totales fué el método colorimétrico de la fosfo-sulfo-vainillina, como ya se describió en el capítulo III.d.2.

Los valores obtenidos de las muestras analizadas según figura en el cuadro n° 28, se calcularon previo ajuste a una curva patrón por el método de los mínimos cuadrados (cap.III.d.).

Resumimos a continuación los resultados de los lípidos totales séricos desde el día 0 (día del comienzo del ayuno) hasta el día 7 del ayuno.

CUADRO N° 28

días de ayuno	0	1	2	3	4	5	6	7
\bar{X}	232,99	212,77	291,03	286,48	130,28	134,66	188,97	193,02
n	4	8	4	4	4	4	4	3
D.S.	6,57	15,5	12,47	15,23	13,25	11,31	11,62	6,05

Según se ha referido en el caso de la glucosa, el valor hallado para los lípidos totales en el día 1 es el que nos aproxima más a un valor que pudieramos llamar basal.

Se observa un incremento de la concentración de este parámetro en los días 2 y 3: el día 4 desciende marcadamente su concentración tomando un valor de $130,28 \pm 13,25$ mg/100 ml; este valor es el mínimo obtenido en los siete días de ayuno, en el día 5 hay una ligera elevación que sigue ascendiendo en los días 6 y 7 estudiados por nosotros.

DETERMINACION DE LÍPIDOS TOTALES

	conc.	(n)	D.S.	conc.	(n)	D.S.	conc.	(n)	D.S.	conc.	(n)	D.S.	conc.	(n)	D.S.
0	216,49	4	6,10	231,10	2	9,92	229,40	4	3,80	253,29	3	6,40	234,67	4	6,70
1	268,43	5	14,86	198,77	5	16,84	209,46	5	9,98	170,70	2	19,15	216,49	5	16,78
2	285,28	5	20,65	270,67	5	12,00	333,24	3	5,17	274,92	5	13,45	290,92	5	11,10
3	318,35	5	11,98	303,71	5	17,86	286,37	3	15,28	237,48	4	13,75	280,20	5	16,45
4	113,08	4	9,88	115,16	4	16,92	129,24	4	13,15	173,66	4	17,10	120,28	4	9,15
5	173,75	4	11,02	119,10	3	12,90	122,89	5	9,10	120,79	3	13,35	136,56	3	10,20
6	160,76	4	8,15	206,42	3	10,49	199,82	5	14,07	167,39	5	13,68	210,48	3	11,75
7	214,10	4	10,27	182,40	4	13,40	170,13	3	15,10	186,27	4	11,28	212,21	3	15,46

En este cuadro están expresadas las concentraciones teóricas de Lípidos totales halladas en los cinco días de análisis realizados, con sus desviaciones standard y el número de casos (n), en cada día de ayuno.

Si observamos detalladamente la gráfica nº 49 que es la que nos describe la trayectoria de esta determinación analítica, veremos que hay dos intervalos de tiempo en los que la curva se muestra de signo positivo, uno comienza en el día 1 y el otro en el día 4. Si bien es verdad que la pendiente correspondiente al intervalo de los días 1 a 2 es de mayor magnitud que la correspondiente a los días 4,5 y 6.

Aquí destacamos el hecho de que al haber programado el ayuno en siete días no nos permite seguir la evolución de la trayectoria de los valores séricos de lípidos totales y sólo podemos pues afirmar que en nuestro periodo de ayuno hay un valor mínimo que corresponde al día 4 y que este valor podemos decir divide a la curva en dos partes ó fases una más inmediata y otra tardía de aspecto más lento.

En estudios realizados en ratas en gestación por Robert H. Knopp y col (1973) (129), indican la existencia de dos fases metabólicas dentro del metabolismo del tejido adiposo siendo la primera de carácter anabólica.

Los estudios de Robert D. Scow (1964) (130), nos hablan así mismo de una hiperlipemia en ratas en gestación, se estudian en este caso comparativamente ratas saciadas y ratas en ayuno y se demuestra claramente que en ambos casos se produce una hiperlipemia con elevación de triglicéridos séricos pero con la diferencia de que en las ratas en gestación saciadas, esta hiperlipemia no va acompañada de signos de movilización grasa del tejido adiposo, mientras que en las ratas en gestación en ayunas se produce cetosis, elevación de FFA e incremento de ácidos grasos liberados del tejido adiposo in vitro y acumulación de triglicéridos en hígado y riñón.

Demuestra este mismo trabajo que la inyección de insuli

na decrece la hiperlipemia en ratas en ayunas pero no en las ratas en gestación saciadas.

Podemos decir, que la gestación y el ayuno son dos situaciones de gran demanda energética, de aquí que hayamos establecido un elemento de comparación entre ambos.

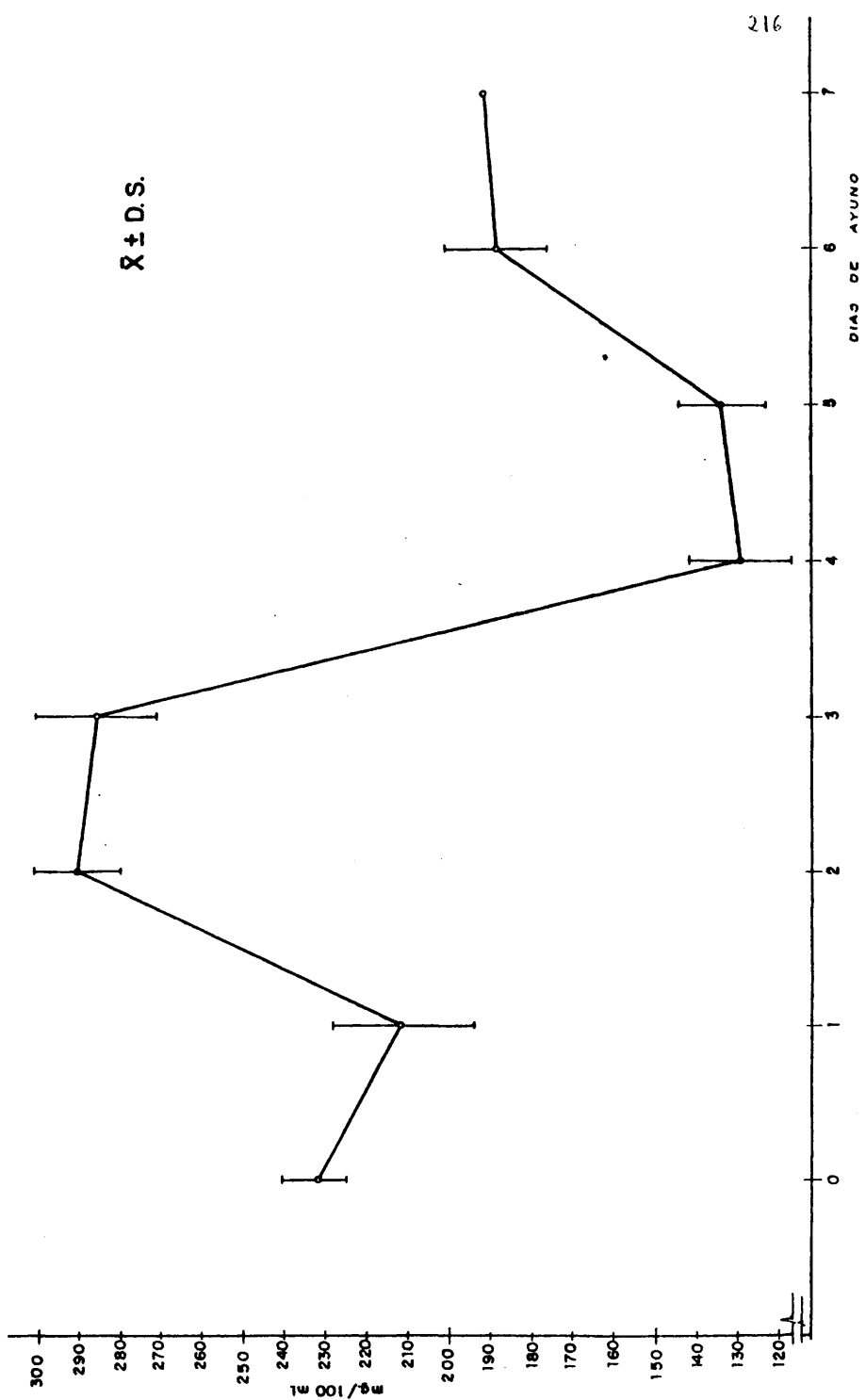


FIG. N.º 49 - LÍPIDOS TOTALES EN EL AYUNO.

IV. g. Resultados de las determinaciones de Colesterol total.

Se ha practicado la determinación de Colesterol total siguiendo la reacción de Liebermann y Burchard según se ha descrito en el capítulo III.d.3.

Los valores teóricos hallados después de ajustados a su correspondiente curva patrón (cuadro n° 30), según se indicó en III.b. los resumimos a continuación:

CUADRO N° 30

días de ayuno	0	1	2	3	4	5	6	7
\bar{X}	63,36	69,71	84,09	86,22	58,71	38,50	47,05	50,91
n	4	6	5	12	8	4	6	8
D.S.	2,30	0,79	4,31	5,26	3,66	1,68	2,31	2,89

El día 0 según se ha referido anteriormente en el día que retiramos la comida y el valor de Colesterol hallado en el día 1 como la cifra control a la que referimos las demás, su valor es de $69,71 \pm 0,79$ mg/100 ml.

Las ratas de nuestro ratario están sometidas a una dieta cuya composición es la siguiente:

Cereales, 35%. Subproductos molinería, 20%. Turtós de semillas oleaginosas, 15%. Leguminosas, 5%. Subproductos industriales, 10%. Harinas animales, 10%. Concentrado minero-vitamínico, 5%. Total, 100%.

Debido a esta dieta observamos que el Colesterol total en

C U A D R O N° 31

DETERMINACION DE COLESTEROL TOTAL

	conc.	(n)	D.S.	conc.	(n)	D.S.	conc.	(n)	D.S.	conc.	(n)	D.S.	conc.	(n)	D.S.
0	62,40	3	3,31	70,82	5	2,15	64,10	4	1,40	58,80	4	3,20	59,71	5	1,74
1	69,69	5	1,02	72,10	5	0,30	67,29	4	1,30	69,69	5	0,64	67,39	5	0,69
2	102,88	5	2,28	79,56	3	4,20	79,00	5	6,15	76,06	5	3,45	82,93	5	5,46
3	68,90	3	4,78	88,01	4	6,14	81,74	3	5,10	118,27	5	3,30	81,90	5	7,02
4	56,89	4	3,96	70,29	5	5,10	53,92	3	2,04	56,79	4	3,70	55,79	4	3,52
5	38,34	3	2,20	37,40	4	1,41	35,20	5	1,78	44,60	3	1,79	37,00	4	1,25
6	53,11	5	2,71	44,86	3	2,37	42,74	5	1,11	47,62	4	2,15	46,34	4	3,20
7	44,99	4	3,74	51,04	4	2,70	48,11	4	1,98	55,90	5	3,57	51,60	4	2,48

Cuadro en el que se representan las concentraciones teóricas de Colesterol, total, así como el n° de determinaciones practicadas en cada día de ayuno (n) y sus desviaciones standard (D.S.).

el día 0 y en el día 1 del ayuno se encuentra alto con respecto a los valores que existen en la Literatura.

En los días 2 y 3 vemos una marcada elevación con respecto a los dos primeros, después comienza a descender hasta alcanzar un valor mínimo en el día 5 cuya concentración es de $38,50 \pm 1,68$ mg/100 ml comenzando desde este momento una pequeña pero marcada recuperación en los días 6 y 7.

Este mínimo observado en el día 5 nos divide la curva de evolución del Colesterol total en dos periodos, en el primero se encuentran aquellas concentraciones que se elevan a lo largo del ayuno, las cuales corresponden a los primeros días del comienzo de esta situación y posteriormente hay un mínimo inferior a la concentración basal calculada, comenzando otro periodo ascendente sin llegar a alcanzar la concentración de Colesterol que denominamos control.

No podemos afirmar que sea efectivamente un segundo periodo, puesto que nuestro ayuno lo hemos finalizado a los siete días.

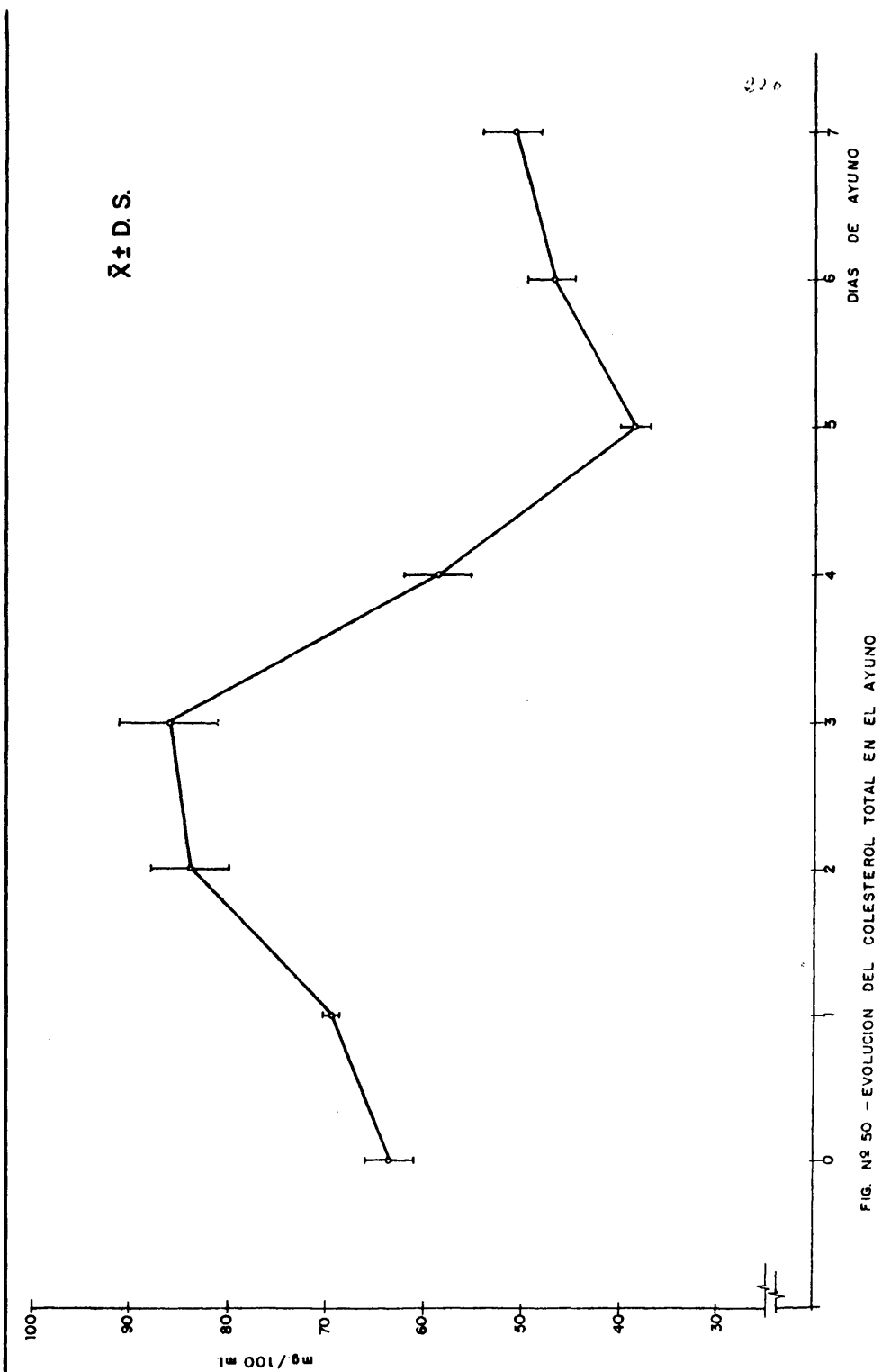


FIG. N° 50 - EVOLUCION DEL COLESTEROL TOTAL EN EL AYUNO

IV. b. Resultados en la determinación de ácidos grasos libres.

La evolución de los ácidos grasos libres durante los siete días de ayuno de nuestro trabajo experimental, fué estudiado por el método descrito por Duncombe según ya expusimos en el capítulo III.d.4.

La respuesta adaptativa, refiriéndose a los FFA, en este proceso de ayuno, demuestra la existencia de una concentración máxima en el día 3, en el que toma el valor de $1,142 \pm 0,2423$ meq/l; este valor máximo viene precedido por un ascenso gradual desde el día 0, y a lo largo de los días 1 y 2.

Si consideramos los FFA como el principal combustible para el conjunto de reacciones metabólicas que ocurren en el ayuno (cap.I.c.2), podemos explicarnos así la movilización, traducida en un aumento en la concentración sérica que ocurra en estos primeros días hasta conseguirse el proceso de adaptación.

El mínimo alcanzado por los ácidos grasos libres durante los siete días se obtiene en el día 4, lo que coincide con la menor pérdida de peso diaria experimentada.

Se describe posteriormente una nueva elevación, no tan marcada como la ya descrita pues alcanza como concentración máxima la de $0,8424 \pm 0,1994$ meq/l; tenemos de esta forma relacionados las concentraciones de lípidos totales y de FFA, con la pérdida de peso experimentado en el proceso.

Los valores hallados para las concentraciones de ácidos grasos libres son los que a continuación se detallan con el número de observaciones (n) y su desviación estandard.

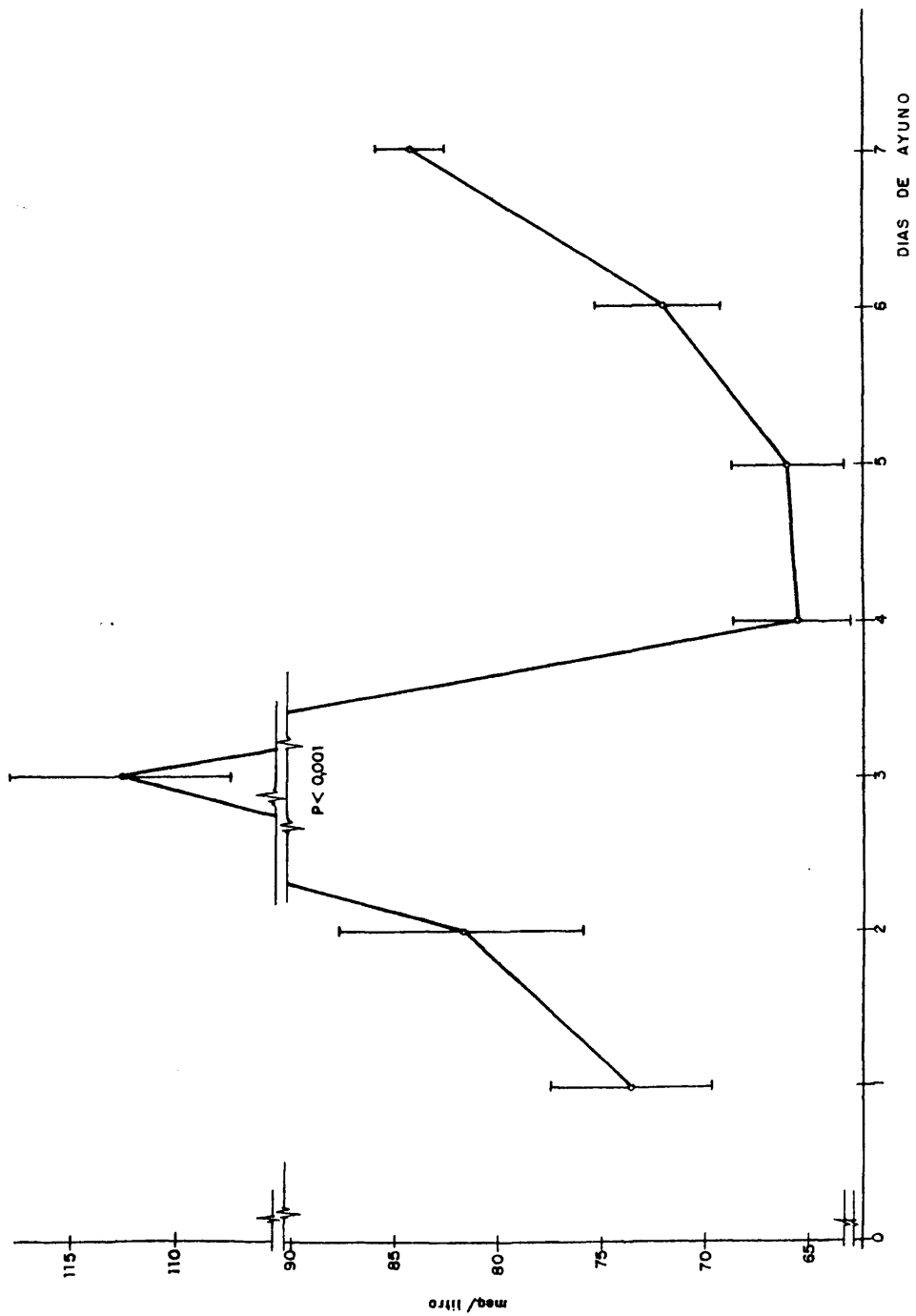


FIG. Nº 51 - EVOLUCION DE LOS ACIDOS GRASOS LIBRES EN EL AYUNO.

C U A D R O N° 33.

ACIDOS GRASOS LIBRES

	meq/l (n)	D.S.	meq/l (n)	D.S.	meq/l (n)	D.S.	meq/l (n)	D.S.	meq/l (n)	D.S.					
0	0,5100	1	0,3800	0,6050	2	0,3500	0,3300	1	0,2300	0,4800	1	0,1500	0,3790	1	0,1200
1	0,8050	5	0,1420	0,7600	5	0,7500	0,7100	4	0,1390	0,7650	5	0,0905	0,6400	4	0,1011
2	0,7150	5	0,3430	0,8160	4	0,3268	1,003	4	0,2534	0,9400	5	0,2218	0,6380	4	0,2203
3	0,9072	5	0,2247	0,3603	5	0,2410	1,3843	4	0,2634	1,1600	5	0,1706	0,8986	4	0,3118
4	0,6025	4	0,3947	0,9015	5	0,4560	0,6210	5	0,4215	0,5310	5	0,3740	0,4340	5	0,2706
5	0,7418	4	0,2111	0,8456	5	0,2402	0,7373	3	0,1908	0,5215	4	0,1411	0,4712	4	0,1782
6	0,7016	4	0,1990	0,9911	3	0,1801	0,8023	4	0,1901	0,6215	4	0,2102	0,5439	4	0,1820
7	0,9705	3	0,2046	1,0414	4	0,2234	0,8405	4	0,1968	0,6400	4	0,1657	0,7200	4	0,2068

Cuadro que representa el total de las determinaciones de Ac. grasos libres (FFA), distribuidos en los cinco análisis realizados, se incluyen el número de determinaciones analíticas parciales (n); así como las desviaciones estandard de cada una de ellas.

COMENTARIO A LOS RESULTADOS.

En el comportamiento de la pérdida de la pérdida de peso en los cuatro grupos, nosotros nos hemos propuesto en el planteamiento de este trabajo seguir su evolución durante el ayuno para ver si el peso inicial influye en esta evolución y en la pérdida total. Lo primero que trataremos de analizar es conocer la cuantía del exceso de peso en el tiempo 0 del segundo, tercero y cuarto grupo: para ello llamamos al peso que tiene el primer grupo en el día 0 peso ideal, por lo ya razonado anteriormente (cap.III), calculamos pues en % lo que se apartan de este peso ideal los restantes grupos en el día 0.

Llamamos a los 282,26 gramos, que es el peso medio de las ratas del primer grupo en el día 0, un 100%; practicando una regla de tres simple hallamos, en tanto por ciento, lo que exceden de ese peso ideal los restantes grupos en el día 0.

Así obtenemos:

	gramos	día 0
1 ^{er} grupo	282,26	100 %
2 ^a grupo	322,26	114,27 %
3 ^{er} grupo	376,57	113,42 %
4 ^a grupo	455,21	161,27 %

Lo que nos dice que el 2^a grupo supera al peso ideal en un 14,27 %; el 3^{er} grupo en un 33,42 % y el 4^a grupo lo hace en un 61,27 %.

Los pesos alcanzados por los cuatro grupos son los que a continuación se detallan:

	gramos
1 ^{er} grupo	202,49
2 ^a grupo	254,67
3 ^{er} grupo	252,60
4 ^a grupo	364,97

Si comparamos el exceso de peso de los grupos 2^a, 3^a y 4^a respecto al día 0 del primer grupo,

tenemos que:	(día 0)	(día 7)
	%	%
2 ^a grupo	114,27	90,09
3 ^{er} grupo	133,42	100,00
4 ^a grupo	161,27	129,30

De la comparación anterior, se puede resaltar que el exceso de peso inicial no se mantiene. El 3^{er} grupo llega a alcanzar el peso ideal a los 7 días de ayuno; el 4^a grupo le supera aún en un 29,30 % mientras que el grupo de ratas tomado como grupo control (1^{er} grupo) disminuye un 9,91 % del peso que tenía al comienzo del ayuno.

Podemos pues afirmar que el peso inicial influye determinando el comportamiento de la pérdida de peso experimentada en el ayuno, ya que nuestros experimentos así lo demuestran para un ayuno de siete días en un grupo de ratas de diferentes pesos.

El segundo punto planteado anteriormente, que es conocer como influye el peso inicial en la pérdida total de peso al finalizar el período de ayuno, lo tratamos analizando primero los gramos de pérdida en el día 7 que experimenta cada grupo de ratas, así tenemos:

Una forma de poder interpretar las variaciones de los pa
rámetros analizados es relacionarlos entre sí, buscando su in
terdependencia si la hay y en caso contrario intentar explicar
su ausencia.

Al observar las gráficas confeccionadas anteriormente so
bre los parámetros descritos se resalta, y por ello hacemos
hincapié en el valor mínimo que toman todos ellos (a excepción
de los FFA) en el día 4 del periodo de ayuno estudiado.

Nosotros planteamos aquí la hipótesis de que en el primer
día la pérdida de peso aunque es considerable (18 gramos), no
sea a expensas de una movilización tisular, puesto que el ani
mal en las primeras 24 horas de ayuno está perdiendo peso en
consonancia a la previa ingesta de alimentos en estado que pu
dieramos llamar de saciedad.

Esto lo podemos así mismo corroborar si realizamos una
correlación entre tiempo de ayuno y pérdida de peso en los cua
tro primeros días. Al realizarla obtuvimos un valor para r de
-0,898261, si nosotros tomamos ahora únicamente como tiempos
a correlacionar los días 2,3 y 4, esto es, prescindimos del
día primero de ayuno, r toma en este caso el valor de -0,998168
y la ecuación de la recta queda expresada de la forma:

$$Y = 38,3983 - 9,095 t$$

(Y pérdida de peso en gramos; t días en los que se experimenta
la pérdida de peso).

Obteniendo con esta correlación que la sumatoria de las
diferencias con el valor central al cuadrado toma el valor mí
nimo de 0,6144.

G	día 0		día 7		gramos
1	282,26	-	202,49	=	79,77
2	322,26	-	254,67	=	67,59
3	376,57	-	282,60	=	93,97
4	455,21	-	364,97	=	90,27

Aparentemente se observa que los grupos 3ª y 4ª, tienen una pérdida total mayor que los dos primeros y así también entre estos dos, el grupo 3ª es el que más pierde; pero esta pérdida decimos que tiene que ir relacionada con el peso inicial, para lo cual lo expresamos en tanto por ciento de pérdida de peso, porque de esta manera podemos unificar el criterio de pérdida de peso para los cuatro grupos.

De este modo:

G	día 0	día 7
1	100 %	28,26 %
2	100 %	20,99 %
3	100 %	24,95 %
4	100 %	19,85 %

Ahora sí podemos decir que los gramos de pérdida de peso se transforman en tanto por ciento equivalente a:

G	gramos	%
1	79,77	28,26
2	67,59	20,99
3	93,97	24,95
4	90,97	19,83

Lo anteriormente descrito, nos habla en el sentido de que es el 1^{er} grupo el que experimenta mayor pérdida de peso y el 4ª grupo el que pierde menos en relación a su peso inicial.

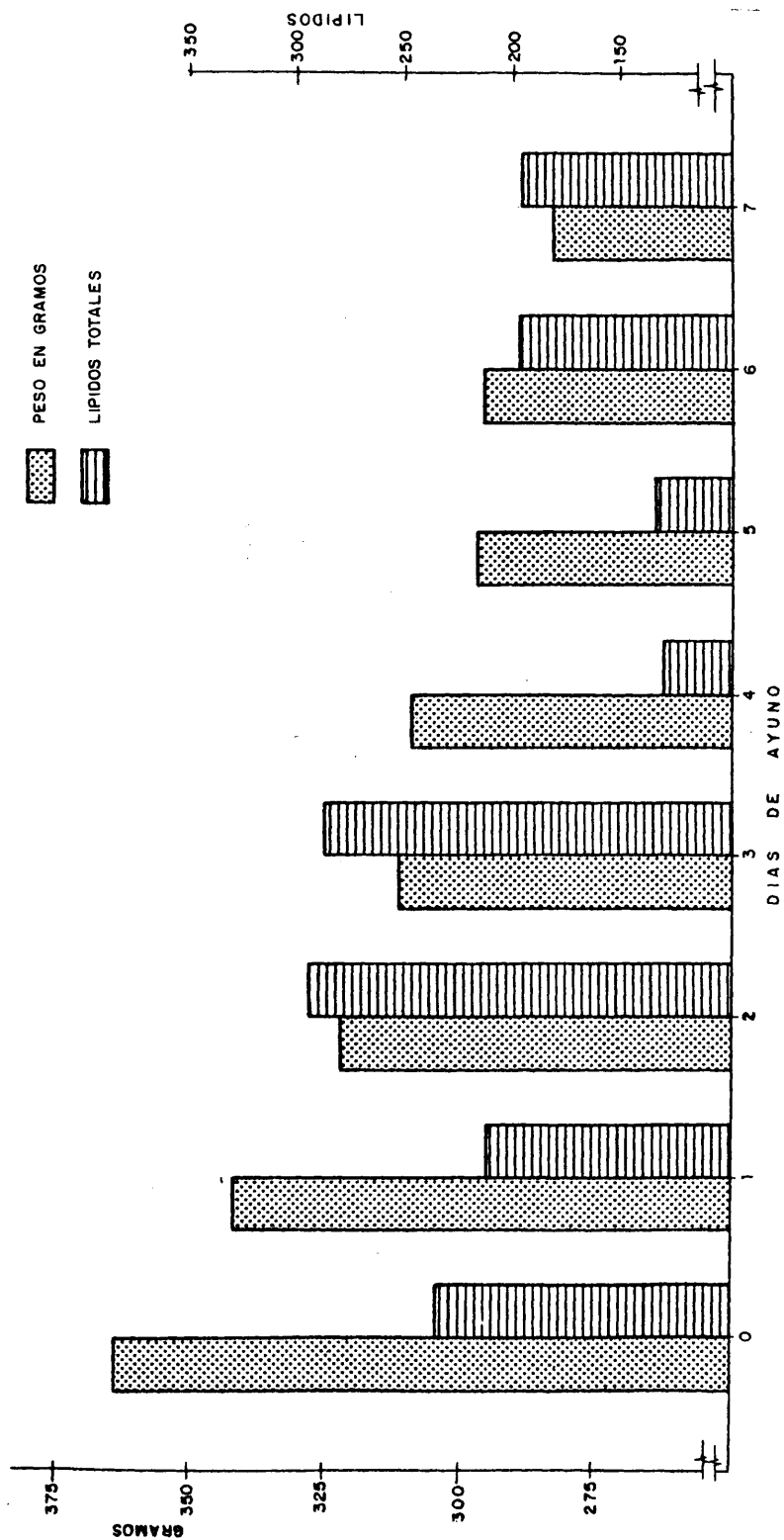


FIG. Nº 52 - HISTORAMA QUE REPRESENTA LA PERDIDA DE PESO COMPARANDOLA CON EVOLUCION DE LOS LIPIDOS TOTALES EN LOS SIETE DIAS DE AYUNO.

Este razonamiento de ajustar la pérdida de peso en los días 2,3 y 4 se hace con la finalidad de buscar una estrecha relación y por ende una explicación a la variación de Lípi dos totales observada en estos días, dejando a priori los res tantes días estudiados.

La dependencia entre los gramos perdidos en los días 2,3 y 4 y la concentración de Lípidos totales hallada en los mis mos días se pone de manifiesto asociando ambos parámetros me diante una correlación lineal; encontramos así que el valor de r para ella es de -0,905521; la ecuación de la recta que se obtiene toma el valor de:

$$Y = 134,847037 - 9,095648 X$$

(Y, pérdida de peso en gramos; X, concentración de Lípidos totales).

Podemos pues afirmar que la variación de Lípidos totales está correlacionada con la pérdida de peso diaria experimenta da por el animal en los cuatro primeros días de ayuno, no he mos encontrado por el contrario, suficientes razonamientos pa ra explicar la segunda fase de la movilización de Lípidos en el intervalo estudiado por nosotros, esto es, en los días 5, 6 y 7.

Planteándonos si existe ó no una estrecha relación entre la variación de Lípidos totales observada y uno de sus compo nentes séricos: el Colesterol, hacemos una representación grá fica con ambos parámetros superpuestos (fig. 63) en forma de histograma que nos resalta la mayor ó menor constancia de pro porcionalidad entre ambos.

Estudiando así mismo el coeficiente $\frac{\text{Lípidos totales}}{\text{Colesterol total}}$, con



FIG. Nº 53 - HISTOGRAMA QUE NOS REFLEJA LA PROPORCION ENTRE LÍPIDOS TOTALES Y COLESTEROL TOTAL, A LO LARGO DEL AYUNO DE SIETE DIAS, AMBOS GRAFICAMENTE VIENEN EXPRESADOS EN mg./100 ml.

la misma finalidad los resultados a los que hemos llegado son los siguientes:

días	0	1	2	3	4	5	6	7
razón $\frac{L.T.}{C.T.}$	3,68	3,05	3,46	3,32	2,21	3,50	4,02	3,79

razón que nos habla en favor de una constante de proporcionalidad entre ambos parámetros mantenida a lo largo de los siete días, presentando la excepción del día 4, como alejados suficientemente de ella.

Estudiando esta misma relación de los Lípidos totales, ahora con otro de sus componentes los FFA, vemos que toma los siguientes valores:

días	0	1	2	3	4	5	6	7
razón $\frac{L.T.}{FFA.}$	19,76	11,28	13,81	9,79	8,22	7,92	10,24	8,9.

Mediante su observación, vemos que el cociente $\frac{L.T.}{FFA.}$ varía de tal manera que en los primeros días está en favor de una mayor proporción de Lípidos totales respecto a los FFA, (días 0, 1 y 2).

A partir del tercer día esta relación disminuye, lo que está de acuerdo con el mantenimiento de las exigencias energéticas del animal a expensas de una elevación de la concentración de ácidos grasos libres en el suero disponible para su utilización, ya que la deprivación de calorías durante el ayuno hace que el animal consuma sus propias calorías almacenadas y decimos pues que un procedimiento para disponer de sus calorías es producir la lipólisis capaz de liberar material energético disponible, cuyos productos seguirán rutas metabólicas diferentes, tanto de síntesis como de degradación.

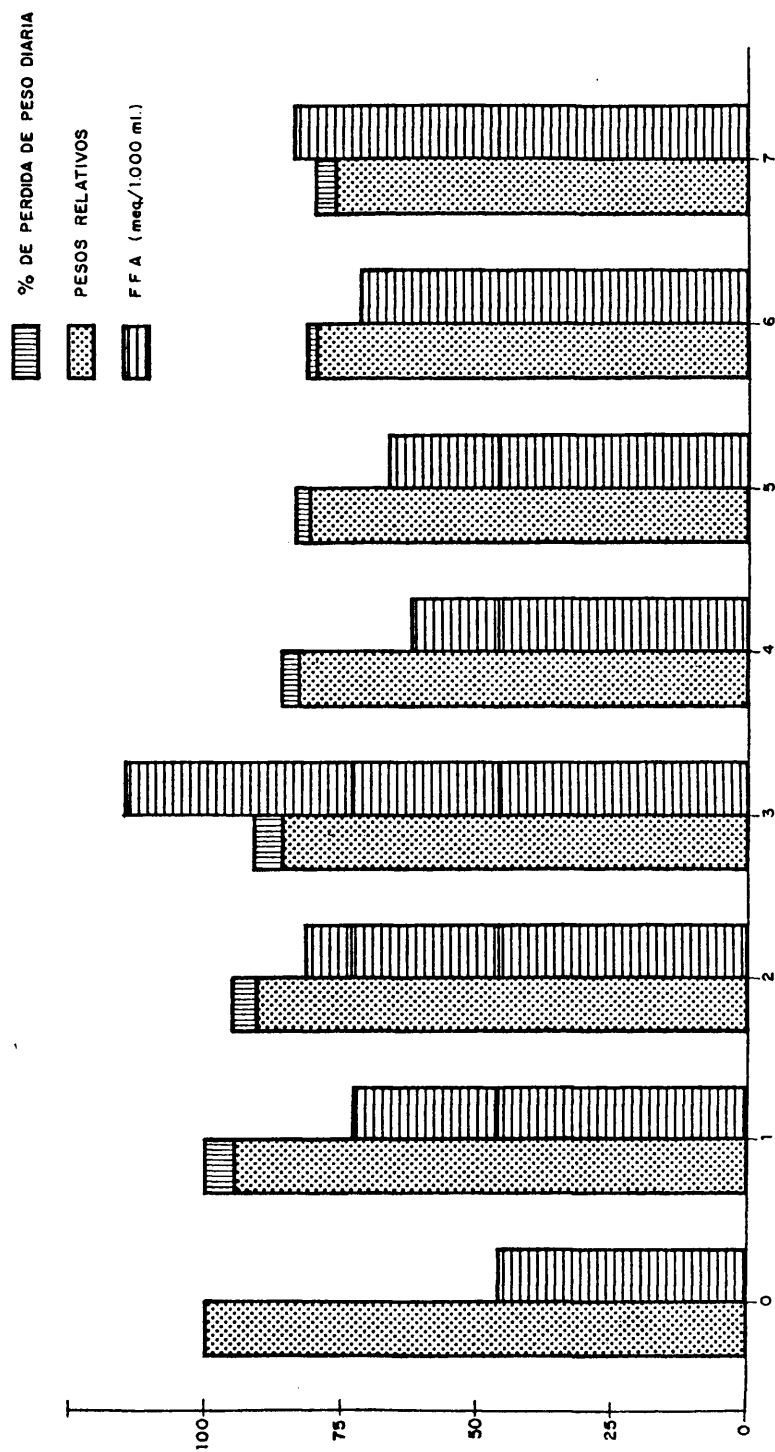


FIG. Nº 54 - HISTOGRAMA QUE NOS PONE DE MANIFIESTO EL GRADO DE LÍPOLISIS (EXPRESADA POR LA FFA PLASMÁTICAS) Y LA PÉRDIDA DE PESO (EN %) DURANTE LOS SIETE DÍAS.

Nosotros hemos llegado a saber que en el día 0 del ayuno, no se realiza la lipólisis, puesto que hay un aporte exterior de energía.

La producción de energía en nuestros animales en ayuno, creemos que vendrá dada por su pérdida de peso corporal, esta pérdida se traducirá en poder energético, que a su vez observamos se manifiesta por un aumento marcado de FFA circulante en el plasma.

De esta deducción, trataremos de marcar la relación que puede existir entre pérdida de peso y necesidades energéticas. La pérdida de peso la vamos a estudiar considerando el peso conservado en cada día como un 100 % de peso, de tal manera que el tanto por ciento obtenido nos refleja la pérdida en tanto por ciento en cada día respecto al anterior y que será la lipólisis que se ha producido en ese día en el animal.

El otro parámetro a comparar son los FFA, que hemos determinado en el plasma (fig.nº51); puesto que en las condiciones de ayuno van a ser los primeros que aportan la energía necesaria en este estado carencial. Si nosotros tratamos de relacionar, de una manera fácil, la pérdida de peso diaria con la modificación plasmática de los valores de FFA, podemos pues tener el grado de afectación tanto a nivel energético como a nivel de mantenimiento (fig.nº54).

IV. i. Determinaciones hormonales;

Efecto del ayuno sobre las concentraciones de insulina plasmática.

La fig nº55 muestra las concentraciones de insulina halladas en los siete días de ayuno además del día 0 en que el animal está comiendo a saciedad, lo que nos va a permitir conocer los niveles de esta hormona en sangre antes de comenzar el periodo de ayuno, y poder así establecer un estudio comparativo para conocer mejor las modificaciones que el proceso experimental estudiado realiza en las concentraciones de insulina circulante.

La gráfica, claramente, permite apreciar un descenso en los niveles circulantes de insulina en los siete días de ayuno respecto a la concentración hallada en el día 0, descenso que se mantiene regulado dentro de unos estrechos límites, puesto que calculada la *t* de Student como medios estadísticos que nos permita conocer la significación de las variaciones halladas en cada día, en ninguno de ellos la probabilidad de que así sea es menor de 0,05.

No ocurre así cuando la *t* de Student se halla en cada uno de los siete días respecto al día 0, puesto que en todos los casos $P < 0,05$.

La concentración de insulina calculada para el día 0, ha sido de $62,612 \pm 15,50 \mu\text{U/ml.}$, produciéndose en el primer día una disminución de un 48,37 %, coincidiendo así con los valores hallados por Usah Lilavivathana y col. en su trabajo publicado recientemente, 1978 (131), "Control of Insulin secretion during fasting in man".

MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES
DE INSULINA \pm D.S.

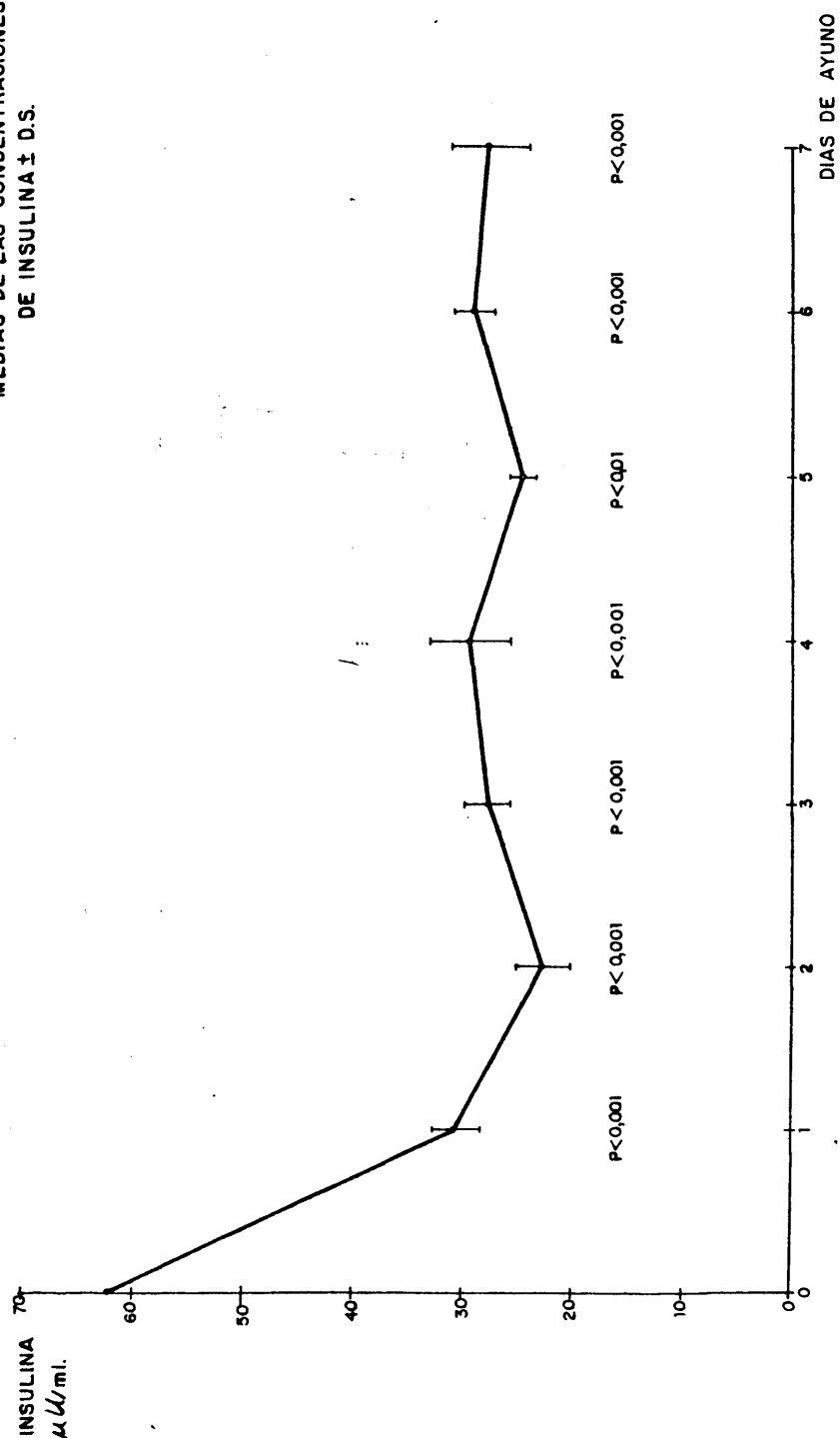


FIG. N° 55 -RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE LA INSULINA, EN LOS QUE SE OBSERVA UNA FRANCA CAIDA RESPECTO A LA CONCENTRACION INICIAL (RATAS SACIADAS).

En el cuadro n° 34 se detallan los valores obtenidos, así como el número de observaciones en cada día y la desviación estandar y el coeficiente de variación.

CUADRO N° 34

t	0	1	2	3	4	5	6	7
n	10	8	4	6	6	3	6	6
\bar{x}	62,612	30,29	22,26	26,99	28,90	24,47	28,46	27,45
D.S.	15,52	8,80	10,90	9,54	13,50	4,099	6,14	14,69
C.V. %	25	29	48	36	47	17	22	53

Tanto el cuadro anterior como la gráfica n° 55 nos permite afirmar que el valor mínimo en la concentración de insulina se produce a las 48 horas de ayuno (día 2), con un valor de $22,26 \pm 10,90$ uU/ml., aunque no difiere significativamente del hallado en los demás días ($P < 0,05$).

La corrección lineal practicada entre los valores medios de las concentraciones de glucosa e insulina para cada día del ayuno, (cuadro n° 35), ponen de relieve una estrecha correlación entre ambos parámetros sanguíneos ($r = 0,916304$), lo que no está totalmente de acuerdo con el mencionado trabajo de Usah Lilavathana ya que este autor no siempre observa tan estrecha correlación en el ayuno nocturno o en un prolongado ayuno, en humanos.

CUADRO N° 35

t	1	2	3	4	5	6	7
I (μ U/ml.)	30,29	22,25	26,995	28,90	24,47	28,45	27,453
G (mg/100ml.)	102,34	93,11	97,48	108,89	84,19	104,51	114,70
I/G	0,28	0,23	0,21	0,26	0,18	0,27	0,23

○ — GLUCEMIAS
 ○ - - - INSULINA

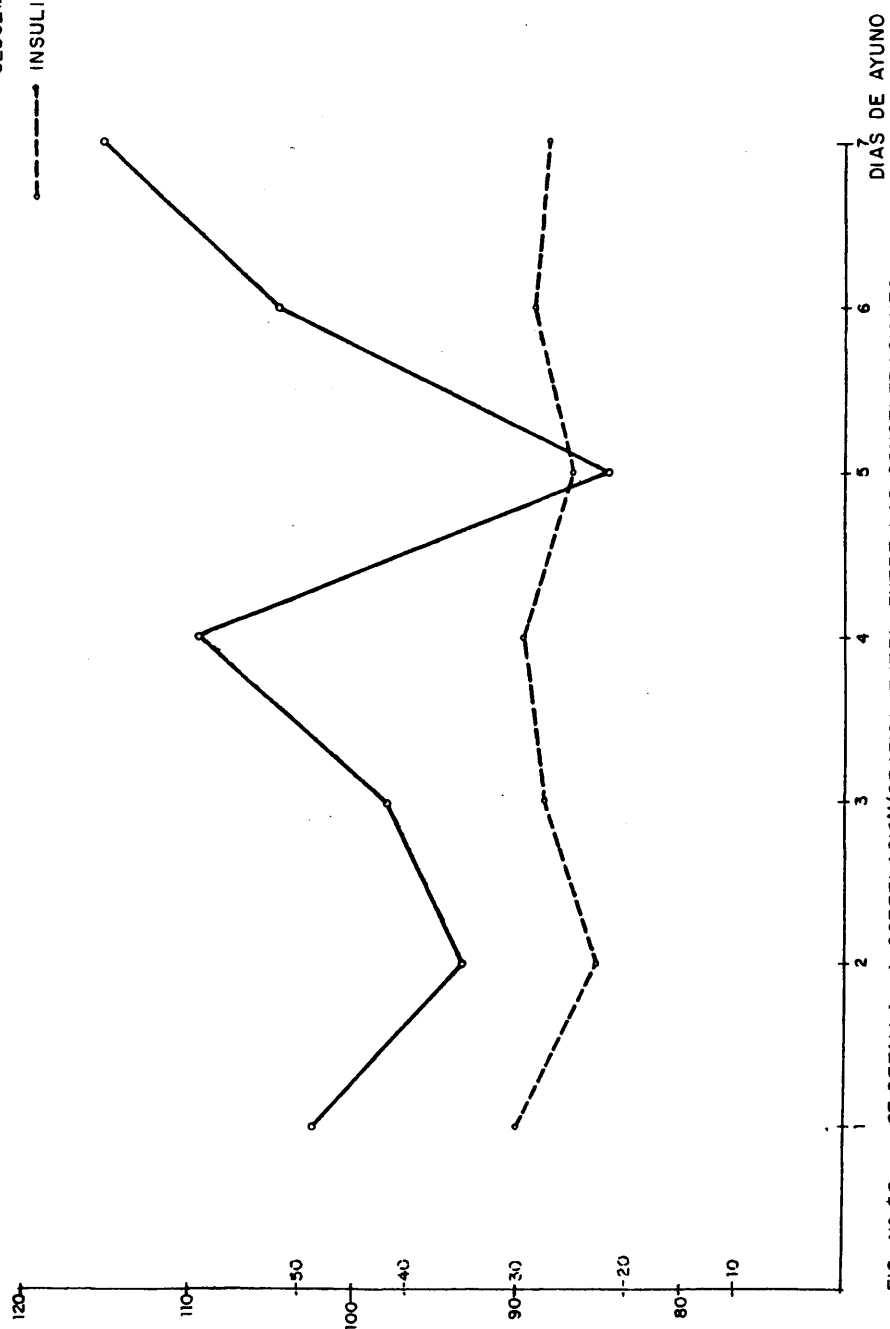


FIG. Nº 56 - SE DETALLA LA CORRELACION (GRAFICAMENTE) ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA E INSULINA EN EL PERIODO EXPERIMENTAL.

Algunos investigadores proponen, que la insulinopenia en el ayuno, es el resultado de una mayor actividad simpática puesto que las catecolaminas plasmáticas y urinarias pueden elevarse durante el ayuno, pero los estudios más recientes encontrados en la bibliografía como los de Misbin y col., 1971 (132), y Walter y col., 1974 (133), así como el ya mencionado de U. Lilavithana no establecen que un bloqueo adrenérgico altere los niveles de insulina en el ayuno e incluso Young y Landsberg, 1976 (134), sugieren que la actividad simpática puede estar disminuida en el ayuno, (al menos en un corto ayuno).

Efecto del ayuno sobre las concentraciones plasmáticas de glucagón.

El demostrado interés que la bibliografía dedicada al estudio de las alteraciones metabólicas que se producen en el ayuno pone de manifiesto hacia la secreción de glucagón esta ampliamente justificado por cuanto esta hormona pancreática interviene de forma definitiva en el proceso de mantenimiento de la glucosa plasmática.

Al realizar la determinación radioinmunológica de glucagón pancreático y según podemos observar en la gráfica nº 57, se produce en el día 3 una elevación que se diferencia significativamente de los valores hallados en el día 0 ($P < 0,05$).

El cuadro nº 36 nos detalla las concentraciones de glucagón halladas en cada uno de los siete días de ayuno, así como el valor del día 0, correspondiente a la concentración de glucagón circulante cuando no se ha retirado la comida

(estado saciado).

CUADRO N° 36

t	0	1	2	3	4	5	6	7
n	15	20	15	19	16	16	17	7
\bar{x}	165,22	189,80	194,57	251,31	176,48	154,68	105,11	86,4
E.S.	21,78	7,00	21,34	38,48	45,13	48,59	10,75	16,4

Se pone de manifiesto como la concentración de glucagón se eleva en las primeras 72 horas de ayuno, para luego ir descendiendo de forma gradual hasta alcanzar en el día 7 una concentración inferior al estado postabsortivo ($P < 0,05$), lo que pone de manifiesto la capacidad de conservación de las proteínas del cuerpo, a medida que aumenta el tiempo de ayuno del individuo sometido a él; Errol B. Marlinssy col., 1970 (135).

Hemos comentado en la Introducción como el cociente glucagón/insulina, es de gran utilidad en este proceso de ayuno, pues define con más propiedad que mediante la observación de los valores aislados de ambas hormonas la respuesta por parte del organismo sometido a él de realizar la síntesis de glucosa en el hígado; sugerido igualmente por Unger y col., 1972 (136).

El cuadro n° 37 detalla los valores de las concentraciones de glucagón circulante (expresado en pg/ml.) así como los de insulina (expresados en μ U/ml.), y el valor que toma el cociente G/I en cada día de ayuno.

CUADRO N° 37

t	1	2	3	4	5	6	7
Glucagón	189,80	194,57	251,31	176,48	154,48	105,11	86,46
Insulina	30,29	22,25	26,99	28,90	24,47	28,46	27,45
G/I	6,27	8,74	9,31	6,11	6,32	3,69	3,16

El glucagón está expresado en pg/ml. y la insulina en μ U/ml.

El mayor valor que adquiere el cociente G/I, es de 9,31 y que se corresponde con las 72 horas de ayuno (día 3), lo que pone de manifiesto en este día una mayor aptitud para que se eleve la glucosa sanguínea como así demostramos que ocurre en el día 4 con un valor para la glucosa de 108,89 mg/100 ml.

Hemos realizado una correlación lineal entre los valores de glucagón plasmático hallados en cada día y los valores de FFA, así como entre estos y los valores de GH, para poder llegar a conocer si entre los parámetros sanguíneos mencionados existe en el ayuno alguna relación matemática que nos permita conocer más profundamente el proceso metabólico que nos ocupa.

El valor obtenido para el coeficiente de correlación r en el primer caso, cuando estudiamos glucagón y FFA plasmáticos, toma el valor de 0,977323 si la tomamos los cuatro primeros días de ayuno (incluyendo además el día 0), y de $r = 0,99487$ en el caso de correlacionar los tres primeros días de los valores de glucagón y GH, pues si ampliamos la correlación lineal con los demás días este coeficiente empeora, aún cuando en el caso del glucagón y los FFA todavía entra los cuatro primeros días r tiene un valor bastante aceptable ($r = 0,917272$).

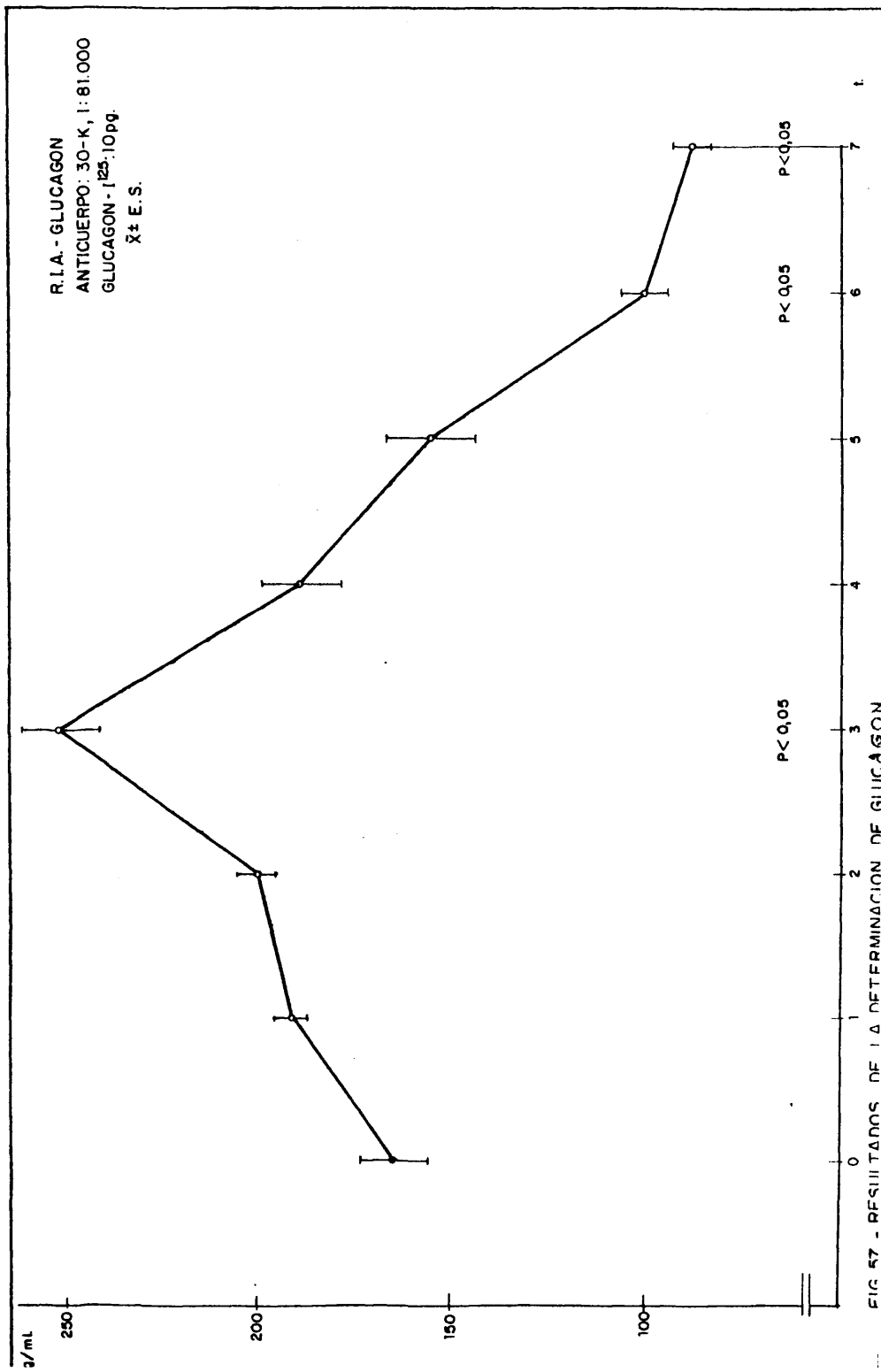


FIG 57 - RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE GLUCAGON

Todo ello nos permite afirmar que entre las dos hormonas lipolíticas que ejercen esta acción en el ayuno y los FFA, como producto de la lipólisis que tiene lugar existe una independencia ya puesta de manifiesto por autores como Cahill G.F. y Herrera M.G. entre otros

Efecto del ayuno sobre la concentración de GH plasmático.

Es conocida en el ayuno la elevación de la GH plasmática en el hombre, la rata y el conejo con su acción movilizadora de los FFA, y disminución en la utilización de glucosa.

No obstante la respuesta es variable y de aquí que haya bastante discrepancias entre los distintos autores que la estudian respecto a su importancia en la homeostasis metabólica en el ayuno, tal como lo refiere G.F. Cahill y col., 1966 (11).

Nuestros resultados se ponen de manifiesto en la fig. nº 58 que nos detalla gráficamente los valores obtenidos en cada día y sus desviaciones estandar, así como que es a las 72 horas de ayuno (día 3), cuando se presenta un pico, correspondiente a una concentración de $0,743 \pm 0,17$ ng/ml. que se diferencia significativamente de las concentraciones llamadas en los demás días ($P < 0,001$).

Las cifras correspondientes a las concentraciones de GH, expresadas en ng/ml. están recogidas en el cuadro nº en el que en cada día de ayuno se describe el número de observaciones y la desviación estandar de las concentraciones.

CUADRO N°

t	1	2	3	4	5	6	7
\bar{x} (ng/ml.)	2,9	2,8	7,4	3,7	3,3	3,2	3,6
n	8	7	7	3	4	5	5
D.S.	0,10	0,06	0,17	0,14	0,10	0,14	0,13

La elevación que podemos observar en el día 3, representa un aumento de un 2,5 respecto a la concentración de GH en las primeras 24 horas de ayuno.

Destacamos el hecho de que esta mayor concentración de la GH en el tercer día de ayuno corresponde claramente con la elevación plasmática de los FFA en este mismo día y que la trayectoria en los 5 primeros días es totalmente comparable para ambos parámetros, de aquí que hallamos probado la posibilidad de una estrecha correlación entre las concentraciones de GH y de FFA en el ayuno, obteniendo un resultado satisfactorio en los 5 primeros días, ya que cuando la correlación empeora ($r=0,7236$), pues la suave elevación de la GH que se observa del día 6 al 7 la experimentan los FFA de forma más rápida.

Todo ello nos lleva a apoyar la teoría expuesta por Felig P. y col., 1971, (137), en cuanto que la HG actúa en el ayuno manteniendo la acción lipilítica a expensas de una liberación de FFA del tejido adiposo, que suministre la energía necesaria para el metabolismo dentro del proceso de total ausencia de calorías de origen exógeno, que nos ocupa.

El hecho de que las concentraciones de glucosa plasmática se vean aumentadas en el día 4 (gráfica n° 48), apoya la teoría de Misbin y col., 1971 (132), en el sentido de

una acción diabetógena de la HGH.

Este efecto diabetógeno, de la GH, es más marcado en los días 6 y 7 del ayuno programado en este trabajo experimental, en los que a expensas de una moderada pero continua elevación de las concentraciones de HGH plasmáticas se mantienen niveles altos de FFA (0,72-0,84 meq/l.) y la glucemia experimenta una continua elevación que difiere significativamente los días anteriores (excepto del día 4) superando la concentración de las primeras 24 horas de ayuno considerado en este trabajo como correspondiente al valor de glucemia basal en las ratas.

CONCENTRACIONES MEDIAS
DE G. H. \pm D. S.

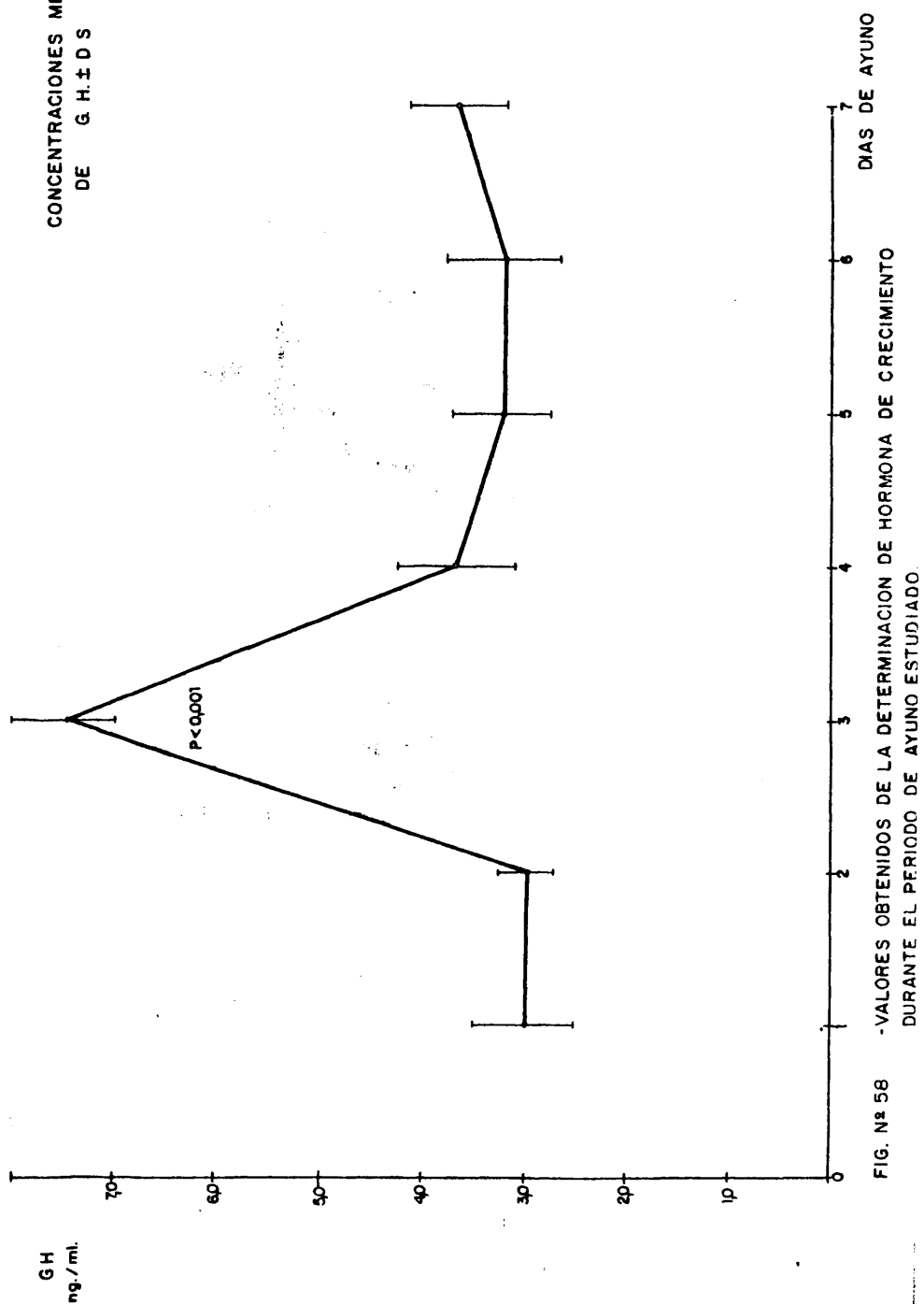


FIG. N° 58 - VALORES OBTENIDOS DE LA DETERMINACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO DURANTE EL PERIODO DE AYUNO ESTUDIADO

V.- DISCUSION

DISCUSION

Ha tenido particular interés en los últimos años utilizar un ayuno total como medida para reducir el peso corporal en pacientes obesos, lo que ha llevado a estimular nuevos intereses en el estudio de los efectos del ayuno, tanto en el sentido de conocer la cuantía de la pérdida de peso que se puede llegar a conseguir con este procedimiento terapéutico, como por lo que de los cambios en la composición del cuerpo pueden derivarse.

Nosotros demostramos en nuestro trabajo experimental, que la pérdida de peso en el tiempo de ayuno se puede describir mediante una hipérbola cuya asintota es el valor al que se aproxima cuando el tiempo de ayuno tiende a infinito, lo que viene a confirmar la teoría expuesta en nuestro Planteamiento de que la pérdida de peso es una función dependiente del tiempo e igualmente nos explica que la ordenada de la asíntota sería el valor mínimo que llegaría a alcanzar el peso en el $t \rightarrow \infty$ sin llegar a confundirse con él.

Lo anteriormente expuesto sobrepasa los estudios de Forbes G.B. (138), que en 1970, describe el proceso de la pérdida de peso en el ayuno, como una función exponencial, aún cuando ya Grande Covián y col. en "La respuesta metabólica frente al ayuno y la infección", (139) publicado en este mismo año, hace la salvedad de que esto es de manera aproximada puesto que no es fácil predecir con exactitud la pérdida de peso producida por una restricción calórica mediante esta función.

El hecho de que el 4º grupo de ratas (las de peso mayor de 400 gramos) consideradas como obesas según el razonamiento expuesto en el cap. III son las que consiguen un

menor tanto por ciento de pérdida en los 7 días (un 19,85 %) nos argumenta a favor de que la pérdida de peso depende del peso inicial (peso del comienzo del ayuno).

Y dado que las ratas que experimentaron una menor pérdida de peso (expresada en gramos) fueron las clasificadas en los grupos 1ª y 2ª, que perdieron respectivamente $77,09 \pm 5,27$ y $76,68 \pm 8,57$ gramos, mientras que las ratas de mayor peso (grupos 3ª y 4ª) perdieron $92,34 \pm 11,33$ y $94,31 \pm 0,06$ gramos respectivamente, nos lleva a afirmar que la pérdida de peso en el ayuno es proporcional al peso inicial.

Nosotros en nuestro trabajo no hemos podido llegar a conocer si el sexo influye en la cuantía de la pérdida de peso, puesto que hemos trabajado con ratas machos exclusivamente, aún cuando el experimento de Saul M. Genuth y col., 1974 (140) así nos lo afirma, ya que trabajando con pacientes obesos de ambos sexos a los que sometió a un régimen de "Semistarvación" durante una semana, consigue una pérdida de peso de $2,1 \pm 0,11$ Kg. para los hombres y de un $1,4 \pm 0,06$ Kg. para las mujeres.

J. Runcie y col., 1974, (141), cuyo periodo de estudio abarcó 30 días, igualmente con pacientes de ambos sexos, pero sometierolos a un total ayuno (les administraba exclusivamente vitaminas hidrosolubles y agua sin restricción) observó que si bien en los primeros 14 días de este periodo experimental se observó una diferencia significativa en cuanto a la pérdida que ambos grupos experimentaron ($10,17 \pm 1,84$ Kg. para los hombres y $7,68 \pm 1,74$ Kg. para las mujeres) cuando el periodo estudiado fue más largo (hasta 30 días), tal diferencia quedó anulada y la media de la pérdida de peso fué similar para ambos (sin diferencias significativas).

En cuanto al comportamiento diario en la pérdida de peso, podemos afirmar que mientras los dos primeros grupos, son uniforme en su pérdida diaria, los grupos 3ª y 4ª, se retrasan y lo hacen más lentamente a partir del día 4, mientras que en los días 6 y 7 de ayuno, es el 4ª grupo el que se diferencia de forma más acusada de los demás y llega en las últimas 24 horas de ayuno a conseguir una pérdida de un $20,43 \pm 2,59$ % del peso alcanzado en el día 6, a diferencia del $28,74 \pm 2,65$ % de pérdida de peso experimentada por el primer grupo y de un $25,71 \pm 3,12$ % del segundo grupo.

Por todo ello deducimos que la pérdida de peso se hace con uniformidad para los cuatro grupos en las primeras 72 horas de ayuno, y es a partir de este tercer día cuando comienzan a diferenciarse.

Podemos considerar con D.G. Montemurro y col., 1969 (140), que la pérdida de peso es la manifestación externa de los cambios que experimenta el cuerpo cuando se le somete a un corto ó prolongado ayuno; nuestro trabajo si bien no le podemos encuadrar dentro de un prolongado ayuno, lo que si es cierto es que excede en cuanto al tiempo estudiado de lo que se conoce como un corto ayuno (72 horas) y en él ya comienzan a vislumbrarse aquellas modificaciones que van a persistir en un ayuno más largo. Tiene F. Grande Covian publicado en 1968, (141), en su "Energetica and Weight Reduction", una perspectiva de algunos de los efectos básicos y conceptos fisiológicos del metabolismo que permite evaluar los efectos de la restricción calórica sobre la composición del cuerpo y en él nos habla de que da particular interés en el ayuno, la duración del periodo de restricción calórica, así como del error en que puede incurrirse al asegurar que la pérdida de peso está estrechamente relacionada con el contenido inicial del tejido adiposo.

Significación fisiológica de la lipólisis en el ayuno.

Los dos hechos fundamentales que hacen posible la utilización de las grasas de depósito son: el papel de los ácidos grasos libres (FFA), como forma de transporte de la grasa del tejido adiposo y del músculo a los demás tejidos del organismo y la actividad metabólica de ambos así como de los factores hormonales que regulan su actividad lipolítica.

Los ácidos libres del plasma constituyen una fracción muy pequeña de los lípidos plasmáticos. En un hombre normal, después de 16 horas de ayuno la cifra es de aproximadamente 0,6 meq/l. es decir de unas 15 mg. de ácidos grasos libres por 100 ml. de plasma. Nosotros hemos encontrado para las ratas del grupo control en las primeras 24 horas de ayuno la cifra de $0,68 \pm 0,03$ meq/l..

La liberación de los FFA por el tejido adiposo y en menor cuantía del músculo depende de la velocidad de la lipólisis en estos tejidos, lo que a su vez está influida por la concentración glucémica y por varios factores hormonales. Las catecolaminas, el glucagón y varios péptidos hipofisarios como la hormona de crecimiento (GH).

La insulina es la principal hormona antilipolítica/Inhibe la liberación de los ácidos grasos y glicerina por el tejido adiposo y el músculo "in vitro" y produce una acusado descenso cuando se inyecta en el hombre y otros mamíferos.

Las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina producidas por la médula suprarrenal y liberadas después de la acción postsináptica de la acetil colina), a través de la

inervación simpática del adipocito, provocan la formación de AMP cíclico que aumenta la actividad de la lipasa celular, y en consecuencia la liberación de los ácidos grasos procedentes de los triglicéridos almacenados. Este es uno de los mecanismos por el cual podemos explicarnos un aumento de la lipólisis del tejido adiposo en el ayuno, que se pone de manifiesto por unos mayores niveles circulante de lípidos totales, que alcanzan su cota más alta en los días 2 y 3 de ayuno (sin diferencia significativa entre ambos), lo que se acompaña de una elevación en el colesterol total sérico en los mismos días así como por la aguda elevación que experimental los FFA en el día 3 con una concentración de $1,142 \pm 0,24$ meq/l..

En este sentido tenemos los resultados obtenidos por Christensen N.J. en 1974 (144), que demuestra como la norepinefrina circulante aumenta durante los tres primeros días de ayuno.

La brusca caída de los niveles circulantes de FFA en el día 4, apoyan las teorías que establecen diferencias entre la acelerada lipólisis que acompaña a los primeros días del ayuno (periodo de transición) y la continua pero más discreta lipólisis que se mantiene en un ayuno de mayor duración.

Se puede así hablar tanto a favor de una menor sensibilidad del tejido adiposo a la estimulación del sistema nervioso simpático en un ayuno más prolongado, lo que se traduciría en una disminución de la lipólisis, como que otros mecanismos no adrenérgicos estén también coadyuvando en este proceso.

Control hormonal de la lipólisis. Efecto lipolítico del glu

agón.

Entre los mecanismos hormonales que median en la lipólisis del ayuno, destacamos la acción del glucagón.

"In vitro", el glucagón incrementa la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo de rata, (Steinberg y col., 1959; Hagen, 1960; Weinges, 1961), (145,146,147). Este efecto da como resultado un aumento de la lipólisis (Weinges y Löffler, 1965) (148). Un efecto sobre la liberación de los ácidos grasos libres ha sido detectado por Weinges, 1961, (147), con concentraciones de glucagón de 0,004 µg/ml. y por Lefevre, 1966, (149), con concentraciones de 0,002 µg/ml. que están en el rango de los niveles plasmáticos hallados por Unger y col., 1962, (150).

"in vivo", los efectos del glucagón sobre la liberación de los FFA del tejido adiposo ha dado resultados más conflictivos. Lefevre en 1965, (151), trabajando con humanos, induce con dosis de glucagón de 1 mg/m², una caída inicial de las concentraciones de FFA plasmáticos a la que sigue una marcada elevación entre las 2 y 5 horas de la inyección. Podría reproducirse esta caída inicial por una hiperglucemia de la misma magnitud como la que provoca el glucagón a las dosis indicadas. La secundaria elevación podría corresponderse al efecto movilizador de la grasa por esta hormona.

Las primeras 24 horas de ayuno, han producido en nuestro trabajo experimental una elevación del glucagón de un 14 %, que siguió elevándose hasta llegar a alcanzar en el día 3 un 53 % de aumento respecto a los niveles encontrados cuando el animal está saciado; la estrecha correlación obtenida para estos cuatro primeros días de nuestro experimento entre los FFA y el glucagón plasmático permite afirmar

la acción lipolítica del glucagón sobre el animal entero en el ayuno.

Prosiguiendo su trayectoria en los sucesivos días estudiados, se puede observar una caída de los niveles circulares hasta alcanzar en el día 7 del ayuno niveles más bajos de los encontrados antes de comenzar el proceso estudiado (un 48 % menos).

Estas observaciones están apoyadas por los trabajos de E.B. Marliss y col. en humanos, 1970 (135), y confirman lo expuesto por Aguilar-Parada y Unger que ha demostrado una elevación del 50 % en los niveles plasmáticos de glucagón en 3 días de ayuno en voluntarios de peso normal, 1969 (152).

Pero la persistente caída que se produce en los niveles de glucagón en los días 6 y 7, mientras que los FFA experimentan una lenta pero clara recuperación en estos días plantea el dilema de que otras acciones hormonales estén en el ayuno manteniendo la lipólisis a fin de procurar al organismo sometido a él los requerimientos energéticos para su metabolismo ante el hecho de la falta total de aporte de sustrato de origen exógeno.

Efecto de la insulina sobre el control de la lipólisis.

Los bajos niveles de insulina que se han podido medir en los siete días de ayuno (sin diferencias significativas entre ellos, pero sí significativamente diferentes del encontrado para el día 0, $P < 0,001$), nos dan a conocer como el proceso homeostático que se desencadena en el ayuno tiene de a inhibir la acción lipogénica que esta hormona posee a expensas de la glucosa y el acetato.

Ya en 1967 (153), los trabajos de Willy J. Malaisse y col., nos demuestran como el ayuno causa una marcada reducción en la respuesta de los islotes a la glucosa, lo que lleva consigo un cierto decrecimiento del contenido de insulina del páncreas.

Igualmente Saul M. Genouth y col. en 1966 (154), explican como a través de una sobrecarga oral de glucosa en los individuos sometidos al ayuno (utiliza diabéticos y no diabéticos) se observa un fallo en el mantenimiento de los niveles de insulina a los que pretende dar varias explicaciones, como insensibilidad pancreática a la glucosa, decrecimiento de los comportamietnos pancreáticos de insulina o aumento por el hígado de los requerimientos de insulina.

Estos trabajos, de acuerdo con las teorías de Soeldner y col. 1965 (155), no observan hiperinsulinemia después de la administración intravenosa de glucosa en individuos normales sometidos a un ayuno de siete días, lo que sugiere una relativa insuficiencia de insulina cuando la deprivación calórica es prolongada, que puede explicarse por un descenso en la respuesta pancreática a la glucosa.

G.F.Cahill y col. en 1966 (11), en su "Hormone fuel, interrelationship during fasting", acepta el punto de vista de que el papel de la baja pero bien regulada concentración de insulina durante el ayuno, es como modulador del flujo de glucosa dentro del torrente circulatorio; si ello representa un efecto directo ó indirecto sobre el hígado, es otro problema. El hallazgo de una fosfotransferasa hepática, glucokinasa, cuya actividad se incrementa después de la administración de insulina ó por una alimentación de carbohidratos y decrece cuando la insulina es deficiente, hizo sugerir que la insulina afecta directamente al hígado.

La evidencia de que la insulina en las concentraciones que se observan en el ayuno, puede controlar el flujo energético al hígado, está completamente apoyada por los trabajos de Fain, Kowac y R.O.Scow, 1966 (156), que han demostrado la gran sensibilidad del tejido adiposo a la actividad lipogénica de la insulina, demostrando que concentraciones de insulina en el rango de 1 μ U/ml. pueden inhibir la liberación de glicerol y FFA, del tejido adiposo estimulado por diversas hormonas. Reichard (157), ha obtenido este efecto en concentraciones de insulina aún por debajo de este nivel subfisiológico. (1963).

Estos trabajos soportan la hipótesis de que durante el ayuno, una fina regulación de la insulina modula la liberación de sustratos en el hígado y más directamente la concentración de glucosa en los fluidos circulantes. El significado del coeficiente de correlación lineal entre la glucosa y la insulina, dice Cahill, soporta esta hipótesis. Sencillamente un fallo en la glucosa sanguínea debido a su utilización por los tejidos glucosa-dependientes, podría asociarse a un decrecimiento de la insulina y esto a su vez podría producir una liberación de los FFA del tejido adiposo.

Siendo la epinefrina y norepinefrina las únicas sustancias endógenas que inhiben la liberación de insulina a través de un estímulo tanto de los receptores alfa-adrenérgicos como de los beta-adrenérgicos, dando como resultado un efecto neto de inhibición de la secreción de insulina y siendo relativamente reciente el descubrimiento de una innervación autonómica de los islotes pancreáticos (Textbook of Endocrinology), ello ha dirigido la atención sobre el Sistema Nervioso Central como regulador del metabolismo en el ayuno.

Además de estas dos hormonas y del glucagón. se sabe que otra hormona la Hormona de crecimiento (GH), segregada por

el lóbulo anterior de la hipófisis y que aparece elevada en el ayuno posee cierta acción antagónica de la insulina.

En el ayuno es conocida la elevación de la GH plasmática en el hombre, la rata y el conejo con su acción movilizadora de los FFA y disminución de la utilización de glucosa.

No obstante la respuesta es variable y de aquí que haya bastantes discrepancias entre los distintos autores que la estudian respecto a su importancia en la homeostasis metabólica en el ayuno.

Nuestros resultados ponen de manifiesto altos niveles plasmáticos de GH en los siete días de ayuno estudiados, con una elevación en el día 3 significativamente diferente de las concentraciones halladas en los demás días ($p < 0,05$).

Destacamos el hecho de que esta mayor concentración de la HGH en el tercer día de ayuno, se corresponde claramente con la elevación plasmática de los FFA en este mismo día y que la caída experimentada en el día 4, conlleva así mismo a una disminución de los FFA, que vuelven a elevarse gradualmente en tanto aumenta la concentración de GH en días sucesivos. El buen coeficiente de correlación calculado entre las concentraciones plasmáticas de ambos parámetros ($r = 0,7236$) nos lleva a estar de acuerdo con una de las conclusiones que expone Philip Felig en 1971 (158), quien estudiando la respuesta metabólica en un ayuno de tres días a la GH en humanos, llega a exponer que una de las acciones de la GH en el ayuno es la de tener un efecto mantenedor de la acción lipolítica en el ayuno que da como resultado una elevación significativa de los FFA plasmáticos.

Regulación de la Glucosa en el ayuno.

Dado que la concentración de glucosa no llegó a ser nunca inferior a los 80 mg/100 ml., siendo el mínimo alcanzado de $84,18 \pm 11,25$ mg/100 ml., es evidente una regulación de la glucemia a lo largo de los 7 días de ayuno, que evidencia el proceso homeostático al que hemos aludido en nuestra Introducción.

Si bien en este mantenimiento de los niveles de glucosa coadyuvan los persistentemente bajos niveles de insulina, en el sentido de no estimular su captación por aquellos tejidos. no dependientes de la glucosa para la producción de energía, fundamentalmente los músculos y el hígado, en los que se necesitan concentraciones mayores de insulina para que a través del estímulo de los receptores situados en la membrana de sus células se provoquen aquellas reacciones que dan como resultado la penetración en el interior de la célula de la glucosa del medio extracelular, hemos de pensar en otras acciones de distinto carácter a las de la insulina, pero capaces a su vez de explicarnos las discretas oscilaciones observadas, así como la elevación que comienza a manifestarse en el día 6 y que en el último día estudiado permite medir $114,70 \pm 15,87$ mg/ml., concentración que supone un aumento de un 12% respecto a la del día 1.

Si bien el "ciclo de la glucosa-ácidos grasos", ha sido definida por autores como Randle, 1963 (159), y anteriormente por Dole V.P., (160), el primero de los cuales extrapoló al animal entero los experimentos realizados en diafragma y en corazón de rata en los que entre otros hallazgos describe como en animales diabéticos por tratamiento por alloxana (derivado pirimidínico que destruye la capacidad de la célula beta para la producción de insulina), se aumenta la concentración intracelular de los FFA, se aumentan los acil-CoA de los

ácidos grasos de cadena larga, la liberación de glicerol y la concentración de citrato, lo que explicaría como los cambios en los niveles de glucosa y FFA plasmáticos están relacionados entre sí para proveer al organismo de un mecanismo homeostático, nos aclara totalmente el comportamiento de ambos parámetros hasta el día 5, no nos permite encontrar un razonamiento suficientemente firme para explicar que aún cuando en los días 6 y 7 del ayuno programado hay una prolongada elevación de los niveles plasmáticos de glucosa a su vez estén elevándose los de los ácidos grasos libres.

La discreta elevación que en el día 4 se produce en la concentración de insulina (un 7% respecto al día anterior), podría explicar la caída que en ese día se produce en los FFA, como producto de la lipólisis, pues podría ser suficiente para lograr la penetración a través de la membrana del adipocito de la glucosa circulante ($108,89 \pm 16,44$ mg/100 ml.) en ese día, con el consiguiente aumento de la glicólisis (a través de un posible aumento de la hexoquinasa) y en consecuencia disminución de la lipólisis, ya que es conocido la exquisita sensibilidad que poseen los receptores de la insulina hacia esta hormona en aquellas células de mayor resistencia a la penetración de la glucosa como el músculo, el cristalino y los leucocitos.

Control hormonal de la regulación de la glucosa.

Hemos mencionado anteriormente como Cahill, basándose en la estrecha correlación que existe al establecer una regresión lineal entre la glucosa y la insulina (calculado por nosotros en $r = 0,916304$), defiende la hipótesis de que en el ayuno, una fina regulación de la insulina modula la liberación de sustratos en el hígado y más directamente la concentración de glucosa en los fluidos circulantes.

Pero aún cuando la insulina, con su relativa deficiencia en el ayuno permita mantener la glucemia plasmática dentro de un rango fisiológico por las diversas acciones arriba mencionadas (disminución de la transferencia de glucosa a la membrana plasmática, y a través de una disminución en el AMPc, menor actividad de la proteinkinasa, lo que se traduce en una disminución de los enzimas de la fosforilación), no es la única hormona que en el ayuno se modifica para proveer los mecanismos homeostáticos de la glucemia.

Glucogenolisis.

En la rata, el glucógeno produce alrededor de 0,5 μ mol. de restos de glucosa por gramo de hígado por minuto durante el ayuno diurno, Potter, V.R. y col. 1961 (161). Esta velocidad en la glucogenolisis hepática podría explicar la deplección de glucógeno hepático durante un ayuno de 24 horas. Ross, B.D. y col. 1967 (162), demuestra como la glucogenolisis puede aumentarse en el hígado perfundido por adición de hormonas (como la adrenalina y el glucagón) a la perfusión.

Estas experiencias demuestran como la fosforilasa hepática, puede controlarse como hormonas y posiblemente por otros factores que dependen de la concentración de glucosa intracelular.

No es posible sugerir un preciso mecanismo bioquímico que pueda explicar al aumento de la glucogenolisis en el hígado durante el ayuno. Exton y col. en 1971 (163), exponen como el contenido de AMPc se eleva alrededor de un 60% en la rata durante el ayuno, lo que sugieren podría deberse a un aumento en el nivel de glucagón y a un decrecimiento en los niveles de insulina en sangre.

El reciente trabajo de Hers y col. 1976 (164), demuestra como el glucagón provee las bases para un sensible mecanismo regulador sobre dos enzimas: fosforilasa y glucógeno-sintetasa, capaces de controlarse por pequeños cambios en los niveles de glucosa sanguínea.

Gluconeogénesis.

En este proceso, esencial para la síntesis de la glucosa en el ayuno, interviene el glucagón que puede explicarse por que a través de estimular la lipólisis hepática, con el consiguiente aumento en la oxidación de los ácidos grasos se producen concentraciones elevadas de Acetil-CoA y citrato que a su vez estimularían la gluconeogénesis. Sin embargo Exton y Park han demostrado como el efecto del glucagón sobre la gluconeogénesis puede ocurrir a concentraciones fisiológicas.

Como ya hemos señalado en la Introducción de este trabajo, existe una relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de glucagón e insulina en situaciones caracterizadas por hiper ó hipoproducción de glucosa. Parece pues, que la acción del glucagón no debería ser separada de su acción conjunta con la insulina, y así se ha dado como índice para valorar el efecto de ambas hormonas, su relación molar (Glucagón/Insulina). Parrilla y col. 1974 (165), llegan a la conclusión de que relaciones molares entre 2,6 y 0,26, consideradas dentro del rango fisiológico, abolían todos los efectos del glucagón.

Nosotros hemos encontrado que todos los cocientes G/I, superan este cociente de 2,6 (pág. 252), con un valor máximo en el día 4, al que corresponde un cociente G/I de 0,3095, indicándonos que en este día de ayuno se está produciendo una mayor cantidad de glucosa a expensas de la gluconeogénesis he

pática y como fácilmente se advierte al observar la gráfica de la producción de glucosa en cada día, pues aún cuando el intervalo comprendido entre los días 3 y 4 no ha sido estudiado, sí podemos observar que el rendimiento conseguido ha sido lo suficientemente eficaz para elevar la glucosa del día 4 en un 12% aproximadamente respecto al día anterior.

El hecho de que no persista la elevación o el mantenimiento de niveles altos de glucagón en los días siguientes, como pudiera pensarse dada su tan característica acción gluconeogénica, tiene su explicación en la necesidad que tiene el individuo sometido a una deprivación calórica de conservar las proteínas del cuerpo, ya que esta acción gluconeogénica está alimentada por los aminoácidos libres suministrados por el músculo, especialmente por la alanina (166), 1979, aún cuando prácticamente todos los aminoácidos de cadena ramificada (a excepción de la leucina), coadyuvan en la síntesis de la glucosa como precursores del fosfoenol-piruvato.

Es de obligado interés en este estudio hacer ciertas consideraciones de lo que se conoce como:

Estado diabético en el ayuno.

Describiendo este estado, tenemos los trabajos de Mishin y col. en 1971 (132), en el que expone como el ayuno produce un estado caracterizado por intolerancia a la glucosa, cetosis y disminución de la secreción de insulina en respuesta a la sobrecarga oral de glucosa, así como por un aumento de las concentraciones plasmáticas de glucógeno, hormona de crecimiento y ácidos grasos libres.

Y en este sentido destacamos la observación que hemos apuntado anteriormente de como en los días 6 y 7, aún eleván

dose persistentemente la glucosa plasmática no se observa de crecimiento en los niveles circulantes de FFA, lo que no induce a pensar que se ha provocado una intolerancia a la glucosa, ya que aparentemente no es capaz de penetrar a través de la membrana de las células en las que se está produciendo la lipólisis, lo que traería como consecuencia una normalización de los niveles de ácidos grasos libres.

Si este estado llamado "diabético", es a expensas de los persistentes aunque no muy altos niveles de GH, no está suficientemente aclarado, pues otras alteraciones como una posible incapacidad de las células beta para reaccionar ante el estímulo de glucosa a lo largo del ayuno, un posible agotamiento de la insulina de reserva si este estado continua ó bien una adaptación total del cerebro para utilizar los cuerpos cetónicos con desaprovechamiento de la glucosa presente en el medio.

En los últimos años ha tenido un gran desarrollo el estudio de los receptores hormonales aplicado al conocimiento de diferentes situaciones fisiopatológicas. Así pues, la posibilidad de estudiar directa y cuantitativamente la interacción tanto de la insulina como del glucagón a sus receptores específicos daría una nueva luz al conocimiento del proceso homeostático que se desencadena en el ayuno.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Existe una buena correlación entre el tiempo de ayuno y la pérdida de peso corporal.
- 2.- Aún cuando es posible establecer una regresión lineal entre las dos variables (tiempo y peso), no es la trayectoria rectilínea compatible con la realidad vital, ya que el peso de la rata llegaría a anularse al aumentar el tiempo de ayuno en esta correlación, e incluso podría llegar a tomar valores negativos.
- 3.- Al mismo razonamiento llegamos cuando se establece la regresión exponencial entre las dos variables (tiempo y peso), con la única excepción de que mediante esta última el peso no llega a tomar valores negativos.
- 4.- La aplicación de la hipérbola a nuestros datos experimentales, resulta ser la más aconsejable para establecer la relación entre tiempo de ayuno y pérdida de peso, tanto por el hecho de que nos permite explicar adecuadamente la evolución de la pérdida de peso en el ser vivo ante este proceso, como por ser estadísticamente la función a la que mejor se ajustan nuestros datos experimentales.
- 5.- Las ratas de peso inicial comprendido entre 250 gramos y 300 gramos, presentan mayor homogeneidad en la pérdida de peso diaria.
- 6.- Las ratas de peso inicial mayor de 400 gramos (obesas) son las que más variabilidad ofrecen en la pérdida de peso en el ayuno.
- 7.- Se demuestra que al finalizar el periodo de ayuno, observado, las ratas de menor peso inicial han perdido un $28,74 \pm 2,65 \%$, mientras que las ratas de mayor peso so

lo llegan a perder un $20,43 \pm 2,59$ % del mismo.

- 8.- La aguda elevación que experimentan los ácidos grasos libres en el día 3 del ayuno con una concentración de $1,142 \pm 0,24$ meq/l., va seguido de una caída brusca en el día 4 ($0,62 \pm 0,38$), lo que se interpreta como una clara diferencia entre la acelerada lipólisis que acompaña a los primeros días de ayuno (periodo de transición), y la continua pero más discreta lipólisis que se manifiesta en un ayuno de mayor duración.
- 9.- En el día 3 del ayuno se produce una elevación del glucagón pancreático de un 53 % con respecto a los niveles hallados cuando el animal está saciado, lo que confirma lo expuesto por Aguilar-Parada y Unger que demostraron esta misma elevación en voluntarios de peso normal.
- 10.-La estrecha correlación existente entre la insulina y la glucosa defiende la hipótesis apoyada por Cahill, de que en el ayuno, una fina regulación de la insulina modula la liberación de sustratos por el hígado y más directamente la concentración de glucosa en los fluidos circulantes.
- 11.-Dado que la concentración de glucosa no llegó a ser nunca inferior a los 80 mg/100 ml., siendo el mínimo alcanzado de $84,19 \pm 11,25$ mg/100 ml., es evidente una regulación de la glucemia a lo largo de los siete días de ayuno, que evidencian el proceso homeostático al que hemos aludido en nuestra introducción.
- 12.-A través de la buena correlación conseguida entre los niveles de Hormona de crecimiento y ácidos grasos libres en el periodo de ayuno estudiado, se pone de manifiesto como una de las acciones de la Hormona de crecimiento en el ayuno es la de mantener la acción lipolítica, capaz de procurar al organismo la suficiente ener

gía para seguir realizando sus actividades metabólicas.

- 13.- El estudio del cociente Glucagón/Insulina, cuyo valor mínimo es de 3,15 en el día siete, nos habla a favor de una intensa actividad gluconeogénica del glucagón en los siete días de ayuno, acción en la que interviene conjuntamente con la insulina dada la relación inversa entre las concentraciones plasmáticas de ambas hormonas en situaciones caracterizadas por hipo ó hiperglucemia.
- 14.- Se demuestra un efecto diabético de la Hormona de crecimiento, por la que a expensas de una continua pero moderada elevación de la GH plasmática en los días 6 y 7, se mantienen niveles altos de ácidos grasos libres, así como la glucemia experimenta una continua elevación que difiere significativamente de las concentraciones de los días anteriores, por lo que hablamos de evolución hacia un estado diabético en el ayuno, ya que esta elevación de glucosa se produce en presencia de insulina plasmática, indicándonos que la célula beta pancreática continúa sintetizando esta hormona bajo la marcada acción insulínica de la HGH, lo que pone más de manifiesto la intolerancia de la glucosa en los tejidos periféricos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Saudek, C.D., P. Felig
Las reacciones metabólicas en el ayuno.
Am. J. Med., 3: 94, 1976.
- 2.- Genout, S.M., C.J. Goodner, D.J. Koerker, J.H. Werrbach,
P.T. Toivola.
Effects of prolonged fasting on insulin secretion.
Diabetes 15: 798, 1966
- 3.- Conway, M.J., C.J. Goodner, J.H. Werrbach, C.C. Gale
Studies of substrate regulation in fasting.
J. Clin. Invest. 48: 1349, 1969.
- 4.- Goodner, C.J., D.J. Koerker, J.H. Werrbach, P.T. Toivola,
C.C. Gale.
Adrenergic regulation of lipolysis and insulin secretion
in fasted.
Am. J. Physiol. 224: 534, 1973.
- 5.- Fenistein, A.R.
The measurement of success in weight reduction.
J. Chr. Dis. 10: 439, 1959.
- 6.- Grande Covian, F.
Energetics and weight reduction.
Am. J. Clin. Nutr. 21: 305, 1968.
- 7.- Cahill, G.F., Jr.
Starvation in man.
N. Engl. J. Med. 282: 668, 1970.
- 8.- Saver, G.
Loss weight, not shirt: A guide to nearby reducing, Spas
New York Sunday News, 16: 30, 1976.
- 9.- Rath, R., K. Woudra.

Short term fasting in the treatment of obesity.
Naharung 21: 193, 1977.

- 10.- Keys, A., J. Brozek, A. Henschel, O. Mickelsen, H.L. Taylor.
The biology of human starvation.
University of Minnesota Press, Minneapolis, 1950.
- 11.- Cahill, G.F., G. Herrera, A.P. Morgan, J.S. Soeldner,
J. Eteinke, P.J. Levy, G.A. Revichard Jr., D.M. Kipinis.
Hormone fuel. Interrelationships during fasting.
J. Clin. Invest. 45: 1751, 1966.
- 12.- Marliss, E.B., T.T. Aoki, G.F. Cahill, Jr.
Glucagon: levels and metabolic effects in man under
prolonged fasting.
J. Clin. Invest. 49: 61, 1970.
- 13.- Goshke, H., J. Girard, M. Stahl.
Metabolism in total fasting, differences between normal
men and women and obese persons.
Medizinische Zeitschrift 54 (II): 527, 1976
- 14.- Tarrant, M.E., R.H.S. Thompson, P.H. Wright.
Some aspects of lipid metabolism in rats treated with
anti-insulin.
Biochem. J. 84: 6, 1962.
- 15.- Young, J.B., L. Landsberg.
Catecholamines and intermediary metabolism.
J. Clin. End. Metab., 6: 599, 1977.
- 16.- Landsberg, L., J.B. Young.
Fasting, feeding and regulation of the sympathetic ner-
vous system.
New Engl. J. Med., 290: 295, 1978.
- 17.- Grande, F., R. Carmona
La respuesta metabólica frente al ayuno y las infeccion

nes.

Medicine, 24: 1522, 1979.

- 18.- Grande Covian, F.
Adaptation to the Environement.
Ed. Dell. D.B. Washington, 1964.
- 19.- Koerker, D.J., C.J. Goodner, P.T. Toivola, C.C. Gale,
J.E. Ensink.
Adpatation to fasting in baboon I. Influence of feeding
schedule.
Am. J. Physiol., 229: 350, 1975.
- 20.- Goodner, C.S., A. Tustisown, M.B. Davidson, P.C. Chu,
M.J. Conway.
Studies of substrate regulation in fasting I. Evidence
for central regulation by plasma glucose mediated by
the sympathetic nervous system.
Diabetes 16: 576, 1967.
- 21.- Werrbach, J.G., C.C. Gale, C.J. Goodner, M.J. Conway.
Effects of autonomic bloking agents on growth hormone,
insulin, free fatty acids and glucose in baboons.
Endocrinology 86: 77, 1970.
- 22.- Pinter, E.D., C.J. Patee.
Effect of a beta-adrenergic on fasting stimulated fat
mobilitation.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 27: 1441, 1967.
- 23.- Brodie, B.B., G. Krishina, S. Hynie.
On the role of adenil cyclase in the regulation of lipo
lysis in fasting.
Biochem. Pharmacol. 18: 1129, 1969.
- 24.- Koerker, D.J., W. Ruch, E. Chidekel, J. Palmer, C.J.
Goodner, J. Ensink, C.C. Gale.
Somatostatin hypotalamic inhibitor of the endocrine pan
creas.

Science 184: 46, 1974.

- 25.- Koerker, D.J., C.J. Goodner, W. Ruch.
Somatostatin, action on pancreas.
New. Engl. J. Med. 291: 262, 1974.
- 26.- Cuatrecasas, P.
Insulin receptor interactions in adipose tissue cells:
direct measurement and properties.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 264, 1971.
- 27.- Exton, J.H., S.B. Lewis.
The role of cyclic AMP in the interaction of glucagon
and insulin in the control of liver metabolism.
Am. New York Acad. Sci. 185: 85, 1971.
- 28.- Prosser, C.L.
Perspective of adaptation: theoretical aspects.
In Handbook of Physiology, sect. 4.
Ed. Am. Physiol. Soc. Washington D.C. 1964.
- 29.- Richard W. Jones.
Principles of Biological regulation
Ed. Acad. Press. cap. 8: 279, 1973.
- 30.- Tamarit Torres, J.
Fisiologia General
Ed. Marban, pag. 8: 1965.
- 31.- Adolph, E.F.
Early concepts of Physiological regulations.
Physiol. Rev., 41: 737, 1961.
- 32.- Bernard, C.
Introduction to the Study of Experimental Medicine.
Reprinted, Dover, New York, 1957.
- 33.- Bernard, C.
Les Phenomenes de la vie, 1: 113, 1878.

- 34.- Cannon, W.B.
Organization for Physiological homeostasis.
Physiol. Rev. 9: 399, 1929.
- 35.- Velarde, M.G.
Estructuras disipativas y evolución.
Boletín Informativo-Fund. Juan March 68:3, 1978.
- 36.- Prigogine, I.
Introducción a la termodinámica de los procesos irreversibles (trad.)
La Recherche, 3: 547, 1972.
- 37.- Richard, W. Jones.
Principles of biological regulation.
Ed. Acad. Press, cap. 4: 85, 1973.
- 38.- Bellamy, B.
Animal rytms.
Ed. Science Progress, pag. 99, 1970.
- 39.- Phillips, J.G.
Fisiología Ecológica.
Ed. H. Blume cap. 1: 6, 1976.
- 40.- Horrobin, D.F.
Principles of Biological Control.
Ltd. Medical and Technical Publishing Co. 1970
- 41.- Merimee, T.J., J.E. Tyson.
Stabilization of plasma glucose during fasting: normal variations in two separate studies.
New Engl. J. Med., 1: 766, 1976.
- 42.- Stefan, S., M.D. Fajans, J.C. Floyd, Jr.
Fasting hipoglicemia in adults.
New Engl. J. Med. April 1: 766, 1976.
- 43.- Apfelbaum, M.

Efecto de dietas muy restringidas con un elevado contenido proteico.

En Clínica Endocrinológica., cap. 7

Ed. Salvat S.A. pag. 127, 1977.

44.- Curnow, R.T.

Effect of starvation on hepatic glycogen metabolism and glucose.

Metabolism, 27: 315, 1978.

45.- Fisher, M.R., S. Sherwin, R. Hendler et al.

Cinetics of glucagon in man: Effects of starvation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1735, 1976.

46.- Feling, P., J. Wahren.

Aminoacid metabolism in man.

Ann. Rev. Biochem. 44: 933, 1975.

47.- Exton, J.H., L.S. Jefferson, Jr., R.W. Butcher, C.R. Park.

Gluconeogenesis in the perfused liver. The effects of fasting, alloxan diabetes, glucagon, epinefrina, adenosine 3', 5'-monophosphate and insulin.

Amer. J. Med., 40: 709, 1966.

48.- Exton, J.H.

Gluconeogenesis.

Metabolism, 21: 945, 1972.

49.- Cahill, G.F. Jr.

La iniciación en la especie humana.

En Clínica Endocrinológica, cap. 6

Ed. Salvat S.A., pag. 105, 1977.

50.- De Fronzo, R.A., C.A. Cooke, R.F. Andres, G.R. Faloona, P.J. Davis.

The effect of insulin on the renal handling of sodium, potassium, calcium and phosphate in man.

- J. Clin. Invest., 55: 845, 1975.
- 51.- Spark, R.F., R.A. Arky, P.R. Boulter, C.D. Saudek, J. T. O'Brien.
Renin, aldosterone, and glucagon in the natriuresis of fasting.
New England J.M., 292: 1335, 1975.
- 52.- Runcie, J., T.E. Hilditch.
Energy provision, tissue utilization, and weight loss in prolonged starvation.
Brit. Med. J., 2: 352, 1974
- 53.- Goldstein, D.E., T.C. Randall.
Effect of starvation on hepatic glycogen metabolism and glucose homeostasis.
Metabolism. 27: 315, 1978.
- 54.- Goldstein, D.E., A.C. Sutherland, T.C. Randall.
Altered mechanism of glucagon mediated hepatic glycogenolysis during long-term starvation in the rat.
Metabolism, 27: 1491, 1978.
- 55.- Scian, L.F., C.D. Westermann, A.S. Verdesca, J.B. Hilton.
Adrenocortical and medullary effects of glucagon.
Am. J. Physiol. 189: 867, 1960.
- 56.- Marco, J., C. Calle, D. Roman, M. Diaz Fierros, M.L. Villanueva, I. Valverde.
Hyperglucagonism induced by glucocorticoid treatment in man.
New England J.M. 288: 128, 1973.
- 57.- Miller, L.L.
Nature glucagon: a protein catabolic hormone in the isolated perfused rat liver.
Nature, 185: 248, 1960.

- 58.- Sutherland, E.W., G.A. Robinson.
The role of cyclic AMP in the control of carbohydrate metabolism.
Diabetes, 18: 797, 1969.
- 59.- Aguilar Parada, E., A.M. Eisentraut, R.H. Unger.
Effects of starvation on plasma pancreatic glucagon in normal man.
Diabetes, 18: 717, 1969.
- 60.- Bottger, I., G.R. Faloona, R.H. Unger.
The effect of intensive exercise on glucagon pancreatic secretion.
Diabetes, 20: 339, 1971.
- 61.- Philip, F., J. Wharen, M.D. Rose, Hendler, M.D. Gumol Ahlborg.
Plasma glucagon levels in exercise man
J. Clin. Invest., 50: 2703, 1971.
- 62.- Bottger, I., E.M. Schelein, R. Gerald, J.F. Faloona, P. Knochel, R.H. Unger.
The effect of exercise on glucagon secretion
J. Clin. End., 35: 117, 1972.
- 63.- Ohneda, A., E. Aguilar Parada, A.M. Eisentraut, R.H. Unger.
Control of pancreatic glucagon secretion by glucose.
Diabetes, 18: 10, 1969.
- 64.- Samols, E.
The nature and treatment of diabetes.
Ed. Leibel, S.A. y Wrenshall, G.A. pag. 227, 1965.
- 65.- Samols, E., J.M. Tyler, H. Kajinuma.
Proceedings VII the International Diabetes Federation Congress.
Diabetes, 23: 636, 1971.

- 66.- Exton, J.H., L.E. Mallette, L.S. Jefferson, E.H.A. Wong,
N. Friedman, T.B. Miller Jr., C.R. Park.
The hormonal control of hepatic gluconeogenesis.
Rec. Progr. Horm. Res., 26: 411, 1970.
- 67.- Mallette, L.E., J.H. Exton, C.R. Park.
Control of gluconeogenesis from aminoacids in the per
fused rat liver.
J. Biol. Chem. 244: 5713, 1969.
- 68.- Mallette, L.E., J.H. Exton, C.R. Park
Effects of glucagon on aminoacid transport and utili
zation in the perfused rat liver.
J. Biol. Chem., 244: 5724, 1969,b.
- 69.- Weber, G.
Hormonal control of gluconeogenesis.
In the Biological basis of Medicine
Ed. Ac. Press, pag. 263, 1968.
- 70.- Exton, J.H., C.R. Park.
Control of gluconeogenesis in the perfused liver of
normal and adrenalectomized rats.
J. Biol. Chem., 240: 1424, 1965.
- 71.- Cahill, G.F. Jr.
Physiology of insulin in man.
Diabetes, 20: 785, 1971.
- 72.- Start, C.D.
Phyl. Thesis, Oxford University, 1971.
- 73.- Wertheimer, E., B. Shapiro.
The physiology of adipose tissus.
Physiol. Rev., 28: 451, 1948.
- 74.- Gordon, R.S.Jr., A. Cherkes
Uniesterifies fatty acid in human blood plasm.
J. Clin. Invest., 35: 206, 1956.

- 75.- Dole, V.P.
A relation between non- esterified fatty acids and
the metabolism of glucose.
J. Clin. Invest., 35: 150, 1956.
- 76.- Carlson, L.A., L. Oro.
Studies on the relationships between the concentration
of plasma free fatty acids and glycerol in vivo.
Metabolism, 12: 32, 1963.
- 77.- Marcks, V., N. Howorth, F.G. Greenwood
Plasma Growth hormone levels in chronic starvation
Nature, 208: 685, 1965.
- 78.- Roth, J., S.M. Glik, R.S. Yalow, S.A. Berson
Hypoglycemia: a potent stimulus to secretion of growth
hormone.
Science, 140: 987, 1963.
- 79.- Walter, R.M., J.P. Palmer, J.W. Ensink
Evaluation of the role of the adrenergic nervous sys-
tem in glucagon release during fasting.
Diabetes, 22: 301, 1973.
- 80.- Lawrance, A.M.
Radioimmunoassayable glucagon levels in man: effects
of starvation hypoglycemia and glucose administration.
Proc. Nat. Acad. Sci., 55: 316, 1966.
- 81.- Havel, R.J.
Autonomic nervous system and adipose tissue.
Am. Physiol. Soc., 1: 575, 1965.
- 82.- Scow, R.D., S.S. Chernik.
Comprehensive Biochemistry.
Ed. M. Florkin E.H. Stotz, Amsterdam: Elsevier, pag.
18, 1970.
- 83.- Loten, E.G. et al.

- An effect of insulin on Adipose-tissue Adenosine 3':
5'-Cyclic monophosphate phosphodiesterase.
Biochem. J., 120: 187, 1970.
- 84.- Mc. New, J.J., I.M. Sabbat, T. Hoshizaka, A.J. Mandell,
C.E. Spooner, I. Marnes, W.R. Adey.
Urinary excretion values in 2 days food-deprives nures
trained chimpanzee.
Am. J. Physiol., 222: 640, 1972.
- 85.- Randle. P, J. Garland.
The glucose fatty acid cycle: its role in insulin sen
sitivity and the metabolic disturbances of diabetes
mellitus.
Lancet, 1: 785, 1963.
- 86.- Smith, C.U.M.
Las moléculas
Molecular Biology. A. Structural approach.
Ed. Faber and Faber Ltd. Londres, cap. 3, pag. 93, 1968.
- 87.- Lipmann, F., Kaplan, U.D. Novelle, G.D.
.
.
- 88.- Gilberg, E.
Metabolism of aminoacids.
Ann. Rev. Biochem. 30: 239, 1961.
- 89.- Stunkard, A.J., Mc. Laren-Hume.
The results of treatment for obesity.
Arch. Int. Med., 103: 79, 1959.
- 90.- Innes, J.A., W. Campbell, C.J. Campbell, A.L. Needle,
J.F. Munro.
Long-term follow-up of therapeutic starvation
Brit. Med. J., 2: 356, 1974.
- 91.- Laube, H., K. Khole, H. Ditschuneit, E.P. Pfeiffer.

Dauererfolg von fastenkuren

Dtsch. Med. Wschr., 97: 830, 1972.

- 92.- Berger, M., F.A. Gries, P. Berchtold.
Risikofaktoren bei Herzinfarkt: Adipositas.
Therapiewoch, 26: 455, 1976.
- 93.- Munro, J.F., C. Mc. Cuisch, J.A.D. Goodall, J. Fraser,
L.J.P. Duncan.
Further experience with prolonged therapeutic starva
tion in gross refractory obesity.
Brit. Med. J., 4: 712, 1970.
- 94.- Shetty, P.S., R. Junw, W.P.T. James.
Effect of catecholamine replacment with levadopa on
the metabolic response to semistarvation.
Lancet, 1: 77, 1979.
- 95.- Tamarit Torres, J.
Una nueva ley de evacuación gástrica.
Arch. Med. Exp., XVIII: 307, 1955b.
- 96.- Hawk, P.E., B.L. Oser, W.H. Summerson.
Determinación de glucosa.
Química Fisiológica práctica
Ed. Interamericana, S.A. pag. 489, 1949.
- 97.- Somogy
Dertermination of blood sugar.
J. Biol. Chem., 160: 69, 1945.
- 98.- Hagedorn y Jesen
Biochem. Z., 135: 46, 1923.
- 99.- Hultman, E.
Rapid specific method for determination of aldosecc
harides in body fluids.
Nature, 183: 108, 1959.

- 100.- Mazaferri et al.
Use of tests strips with colour meter to measure blood-glucose.
Lancet, 1: 331, 1970.
- 101.- Otto, H. et al.
Prufung eines neuen blutzucker-testttreifens.
Dtsch. Med. Wschr. 93: 1183, 1968.
- 102.- Bloor, W.R.
The determination of small amounts of lipid in blood plasm.
J. Biol. Chem., 77: 53, 1928.
- 103.- Zollner, N, D. Eberhagen.
Unternuchung and bestimunnig der lipoide in blut.
Springer-Verlag 256-258, 1965.
- 104.- Zack, B.
.
.
- 105.- Searcy, R.L., L.M. Bergquist.
A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol.
Clin. Chem. Acta, 5: 192, 1960.
- 106.- Weller, H.
Clinical importance and determination of blood lipids, especially critical observation on cholesterol determinations.
Roentgen Lab. Prax, 15: 63, 1962.
- 107.- Schonheimer, R., W.M. Sperry.
A micromethod for the determination of free and combined cholesterol.
J. Biol. Chem., 106: 745, 1934.
- 108.- Sperry, W., F.C. Brandt.

- The colorimetric determination of cholesterol.
J. Biol. Chem., 150: 315, 1942.
- 109.- Leiboff, S.L.
The determination of total cholesterol and choleste
rol esters in blood.
J. Lab. Clin. Med., 28: 219, 1942.
- 110.- Henry, R.J.
Clinical Chemistry.
Herper and Row, Publ. pag. 833, 836, 838, 1964.
- 111.- Van Gent, C.M., H.A. Van Der Voort, A.M. de Bruyn, F.
Klein.
Determinaciones de colesterol. Estudio comparativo de
métodos con referencia especial a los procedimientos
enzimáticos.
Clin. Chim. Acta, 75: 243, 1977.
- 112.- Dole, V.P.
A relation between non-esterified fatty acids in plasm
a and the metabolism of glucose.
J. Clin. Invest., 35: 150, 1956.
- 113.- Trout, D.L., E.H. Estes, S.J. Friedberg.
Tritation of free fatty acids on plasma: A study of
current methods and a new modification.
J. Lipid. Res., 1: 199, 1960.
- 114.- Gordon, R.S., A. Cherkes, H. Gates.
Unesterifies fatty acids in human blood plasma: II the
transport function of uniesterifies fatty acid.
J. Clin. Invest., 36: 810, 1957.
- 115.- Duncombe, W.G.
The colorimetric micro-determination of non-esterified
fatty acids in plasma.
Clin. Chem. Acta, 9: 122, 1964.

- 116.- Anstall, H.B., J.M. Trujillo.
.
Clin. Chem., II: 741, 1965.
- 117.- Howorth, P.J.N., S. Gibbard, V. Marks.
Evaluation of a colorimetric method (Duncombe) of de
termination of plasma non-esterified fatty acids.
Clin. Chem. Acta, 14: 69, 1966.
- 118.- Brugsh, H., H. Horsters.
Arch. Exper. Path. Pharm., 148: 295, 1930.
- 119.- Yalow, R.S., S.A. Berson.
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
H. Clin. Invest., 39: 1, 157, 1960.
- 120.- Hunter, W.M., F.C. Greenwood.
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature, 194: 495, 1962.
- 121.- Herbert, V., L.K.S. Lau, C.W. Gottlieb.
Coated charcoal immunoassay of insulin.
J. Clin. Endocr. Metab., 25: 1375, 1965.
- 122.- Tamarit Torres, J.
Base matemática del método radioinmunológico.
Ed. SECF- 1^{er} Congreso de Ciencias Fisiológicas. 1975.
- 123.- Eisentraut, A.M., N. Whissen, R.H. Unger.
Incubation damage in the radioimmunoassay for human
plasma glucagon and its prevention with trasylol.
Am. J. Med. Sci., 225: 137, 1968.
- 124.- Li, C.H., N.R. Moudgal, H. Papkoff.
Immunochemical investigation of human pituitary growth
hormone.
J. Biol. Chem., 235N 1038, 1960.

- 125.- Greenspan, F.S., J.A. Cofell, W. Lew, C.T. Peng.
Assay of human growth hormone with ^{131}I -labeled antibody.
J. Lab. Clin. Med., 59: 520, 1962.
- 126.- Molinatti, G.M., F. Massara, E. Strumia, F. Pennisi,
G.A. Scassellati, L. Vancheri.
Radioimmunoassay of human growth hormone.
J. Cucl. Biol. 7ed., 13: 26, 1969.
- 127.- Pennisi, F.
A fast procedure for radioimmunoassay of H.G.H.
J. Nucl. Biol. Med., 12: 137, 1968.
- 128.- Catt, K.J., H.D. Hiell, G.W. Tregear.
A solid phase dis radioimmunoassay for H.G.H.
J. Lab. Clin. Med., 70: 820, 1967.
- 129.- Knopp. R., C.D. Saudek, R.A. Arky, J.B. O'Sullivan.
Two phases of adipose tissue metabolism in pregnancy:
matemathical adaptations for fetal growth.
Endocrinology, 92: 4, 1978.
- 130.- Scow, R.O., S.S. Chernik, M.S. Brinley.
Hiperlypemis and ketosis in the pregnant rat.
Am. J. Physiol. 206: 796, 1964.
- 131.- Lilavivathana, U., R.G. Campbell, R.G. Brodows.
Control of insulin secretion during fasting in man.
Metabolism, 27: 815, 1978.
- 132.- Misbin, R.I., P.J. Edgar, D.H. Lockwood.
Influence of adrenergic recptor stimulation on gluco
se metabolism during starvation in man: effects on
circulatory levels of insulin, growth hormone and free
acids.
Metabolism, 20: 54, 1971.
- 133.- Wlater, R.M., R.J. Dudl, J.P. Palmer et al.

- The effect of adrenergic blockade on the glucagon response to starvation in hypoglycemia in man.
J. Clin. Invest. 54: 1214, 1974.
- 134.- Young, J.D., L. Landsberg.
Decreased sympathetic activity during fasting.
Clin. Res. 24: , 1976.
- 135.- Marliss, E.B., T.T. Adki, R.H. Unger, J.S. Soeldner, G.F. Cahill, Jr.
Glucagon levels and metabolic effects in fasting man.
J. Clin. Invest. 49: 2256, 1970.
- 136.- Unger, R.H.
Insulin/glucagon ratio.
Israel J. Med. Sci., 8: 252, 1972.
- 137.- Felig, P., E.B. Marliss, G.F. Cahill, Jr.
Metabolic response to human growth hormone during prolonged starvation.
J. Clin. Invest., 50: 412, 1971.
- 138.- Forbes, G.B.
Weight loss during fasting: implications for the obese.
Am. J. Clin., 23: 1, 212, 1970.
- 139.- Grande, F., R. Carmena.
La respuesta metabólica frente al ayuno y a las infecciones.
Medicine, 24: 1522, 1970.
- 140.- Genuth, S.M., J.H. Castro, V. Vertes.
Weight reduction in obesity by outpatient semistarvation.
Jama, 230: 987, 1974.
- 141.- Runcie, J., T.E. Hilditch.
Energy provision, tissue utilization and weight loss in prolonged starvation.
Brit. Med. J., 2: 352, 1974.

- 142.- Montemurro, D.C., J.A.F. Stervenson.
Survival and body composition of normal and hipotala
mic obese rats in acute starvation.
Am. J. Physiol., 198 (4): 757, 1960.
- 143.- Grande Covian, F.
Energetics and weight reduction.
Am. J. Clin. Nutr., 21 (4); 305, 1968.
- 144.- Christensen, N.J.
Plasma norepinephrine and epinephrine in untreated dia
betic, during fasting and after insulina administra
tion.
Diabetes, 23: 1, 1974.
- 145.- Steinberg, D., E. Shafrir, M. Vaughan.
Direct effect of glucagon on release of unesterified
fatty acid from adipose tissue.
Clin. Res., 7: 250, 1959.
- 146.- Hagen, J.H.
Effects of the glucagon on the metabolism od adipose
tissue.
J. Biol. Chem. 236: 1.023, 1961.
- 147.- Weinges, K.F.
Der einflub von glukagon und insulin auf den stoffwech
sel der nicht veresterten fattsauren am isolierten
fettgewebe der rate in vitro.
Klin. Wschr., 39: 293, 1961.
- 148.- Weinges, K.F., G. Loeffler.
Glucagonempfindliche lipolystische aktivitat im fatt
gewebe.
Kli. Wschr., 43: 175, 1965.
- 149.- Lefevbre, P.
The physiological affect of glucagon on fat-mobilisaa

- tion.
Diabetologia, 2: 130, 1966.
- 150.- Unger, R.H., A.M. Eisentraut, M.S.M. c. Call, L.L. Madison.
Measurements of endogenous glucagon in plasma and in
fluence of blood glucose upon its secretion.
J. Clin. Invest., 41: 682, 1962.
- 151.- Lefebvre, P., F. Henridul.
Influence du glucagon sur le taux sanguin at la diffe
rence arterio-veineuse des acids gras non esterifies.
Ann. Endocr. (Paris) 24: 889, 1963.
- 152.- Aguilar-Parada, E., A.M. Eisentraut, R.H. Unger.
Effects of starvation on plasma pancreatic glucagon
in normal man.
Diabetes, 18: 717, 1969.
- 153.- Malaisse, W., F. Malaisse-Lagae, P.H. Wright.
A new method for the measurement in vitro of pancrea
tic insulin secretion.
Endocrinology, 80: 99, 1967.
- 154.- Genuth, S.M.
Effects of prolonged fasting on insulin secretion.
Diabetes, 15: 798, 1966.
- 155.- Soeldner, J.S., J. Steinke, M.G. Herrera, G.F. Cahill.
Effect of seven-day fast on glucose tolerance ans se
rum insulin of six normal males.
Endocr. Soc. Abstrs. 66: 17, 1965.
- 156.- Fain, J.N., V.P. Kovacev, R.O. Scow.
Antilipolitic effect of insulin in isolated fat cells
of the rats.
Endocrinology, 78: 773, 1966.
- 157.- Reichard, G.A., N.F. Moury, Jr., N.J. Hochella, A.L. Patterson, S. Weinhouse.

